



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

Sede Amministrativa: Università degli Studi di Padova

Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN : **SCIENZE MEDICHE, CLINICHE E
SPERIMENTALI** INDIRIZZO: **SCIENZE DIABETOLOGICHE** XXI CICLO

STEATOSI EPATICA NON ALCOLICA E DIABETE MELLITO TIPO 2: STUDIO DELL'ASSOCIAZIONE TRA GRADO DI STEATOSI, FATTORI METABOLICI E ALTERAZIONI VASCOLARI

Direttore della Scuola : Ch.mo Prof. ANTONIO TIENGO

Supervisore : Ch.mo Prof. ANGELO AVOGARO

Dottoranda : Dott.ssa ANNA CORACINA

INDICE

RIASSUNTO	1
ABSTRACT	3
INTRODUZIONE	5
NAFLD (Non Alcoholic Fatty Liver Disease)	
- Definizione	5
- Epidemiologia	7
- Storia naturale	8
- Fisiopatologia dell'accumulo di grassi nel fegato	9
- Ruolo dell'insulino-resistenza	9
- Ruolo dello stress-ossidativo	11
- Ruolo delle adipochine e citochine	13
- Clinica	17
- Parametri bioumorali	18
- Diagnostica per immagini	19
- Diagnosi	25
- Terapia	26
- NAFLD come fattore di rischio cardiovascolare	28
- NAFLD e vasculopatia sub-clinica	29
- NAFLD e macroangiopatia	31
- NAFLD e microangiopatia	32
- Relazione patogenetica tra NAFLD e vasculopatia	32
- NAFLD e sindrome metabolica	34
- Diagnosi di sindrome metabolica	35
- Rapporto tra NAFLD e sindrome metabolica	36
- Rapporto tra NAFLD e obesità viscerale	38

OBBIETTIVI DELLO STUDIO	41
PROTOCOLLO SPERIMENTALE	41
- Soggetti studiati	41
- Disegno sperimentale	42
- Ecografia epatica	43
- Vasodilatazione flusso mediata (FMD)	43
- Ecocolordoppler dei tronchi sovraaortici	44
- Spessore medio-intimale carotideo (IMT)	44
PROCEDURE ANALITICHE	46
- Dosaggi biumorali	46
- Quantificazione ecografica della steatosi epatica	47
- Valutazione dell'FMD	48
- Ecocolordoppler dei tronchi sovraaortici	50
- Misurazione dell'IMT	51
- Analisi statistica	52
RISULTATI	53
- Grado di steatosi nei pazienti diabetici	57
- Predizione del grado di steatosi secondo il modello statistico "Ordered Probit"	65
- Correlazioni tra parametri metabolici e vascolari	67
DISCUSSIONE	71
BIBLIOGRAFIA	79

RIASSUNTO

La steatosi epatica non alcolica (NAFLD) si definisce come la presenza di steatosi epatica in soggetti con modesto o assente consumo di alcol e mancata assunzione/esposizione a determinati farmaci o sostanze; è frequentemente associata al diabete, all'obesità e alla sindrome metabolica, tanto da essere considerata da molti autori come la manifestazione epatica della sindrome metabolica, avendo come fattore patogenetico comune l'insulino-resistenza. La storia naturale della NAFLD sembra benigna anche se può evolvere in steatoepatite e in cirrosi ed è stata dimostrata una correlazione tra NAFLD e patologie cardiovascolari (cliniche e subcliniche).

Lo scopo dello studio è stato di valutare la prevalenza ed il grado di steatosi epatica in un gruppo di pazienti affetti da diabete mellito tipo 2 e sindrome metabolica (definita in base ai criteri dell'ATP III), di ricercare i fattori metabolici predittivi del grado di steatosi e di valutare l'eventuale relazione esistente tra steatosi epatica e vasculopatia anatomica (spessore medio-intimale carotideo [IMT] e placche carotidee) e funzionale (dilatazione flusso mediata [FMD]).

E' stato eseguito uno studio osservazionale su 60 pazienti (M/F 25/35) affetti da diabete mellito di tipo 2 e sindrome metabolica afferenti al nostro servizio di Diabetologia. La presenza di steatosi è stata valutata mediante ultrasonografia sia con metodica soggettiva semiquantitativa (4 gradi) sia con metodica oggettiva quantitativa mediante la determinazione del rapporto fegato/rene (6 gradi). La ricerca di placche aterosclerotiche carotidee e la misurazione dell'IMT sono stati eseguiti con ecocolordoppler dei tronchi sovraaortici; la funzione endoteliale è stata valutata mediante ultrasonografia con valutazione della vasodilatazione indotta dall'ischemia a

livello dell'arteria brachiale (FMD). Sono stati misurati i parametri antropometrici (indice di massa corporea e circonferenza addominale), metabolici (assetto lipidico, HbA1c, HOMA), citochine infiammatorie (hs-PCR, IL-6, TNF α), fattori trombotici (fibrinogeno) e adipochine (leptina). E' stato utilizzato inoltre un programma statistico (Ordered Probit) in cui associando alcuni parametri metabolici viene predetta la probabilità del soggetto di appartenere ad una determinata classe di steatosi.

La prevalenza di steatosi è risultata dell'88% (33% steatosi lieve, 33% moderata e 22% grave); l'IMT medio pari a 0.88 ± 0.23 mm; il 63% dei pazienti presentavano placche carotidee; l'FMD (calcolato su 45 pazienti) è risultato ridotto e pari a $5.02 \pm 1.81\%$. Dividendo i pazienti per classi di steatosi abbiamo evidenziato una correlazione tra steatosi e BMI, circonferenza addominale, numero dei fattori della sindrome metabolica, sesso, pressione diastolica, insulinemia, HOMA, HbA1c, colesterolo-HDL (inversa), hs-PCR, fibrinogeno e log leptinemia. Non abbiamo dimostrato invece alcuna correlazione tra grado di steatosi e IMT medio o massimo, presenza di placche aterosclerotiche e valore di FMD. Con il modello di regressione multipla HOMA e waist sono risultati fattori indipendenti che influenzano il grado di steatosi epatica (p 0.033). Associando HbA1c, waist, insulinemia il modello statistico Ordered Probit mi predice il grado esatto o con un errore di un grado di steatosi soggettiva (valutato all'ecografia) nel 96,5% dei casi.

Questo studio conferma che nei nostri pazienti diabetici con sindrome metabolica la NAFLD correla strettamente con obesità e insulino-resistenza, può essere quindi considerata la manifestazione epatica della sindrome metabolica. E' stata dimostrata un'elevata prevalenza di aumentato IMT e di placche carotidee, così come di riduzione dell'FMD rispetto alla popolazione generale, sebbene non sembra esservi correlazione con la steatosi epatica.

ABSTRACT

NAFLD (non alcoholic fatty liver disease) is defined by the presence of hepatic steatosis not associated with a significant alcohol intake nor to the assumption of specific drugs. It is frequently associated with diabetes, obesity and metabolic syndrome. Many authors support the concept that NAFLD is the hepatic manifestation of the metabolic syndrome, and that the insulin-resistance is the common soil in the pathogenesis. Although the natural history of this disease seems to be benign, an evolution toward steatohepatitis and cirrhosis, and a link between NAFLD and cardiovascular (clinical and subclinical) diseases, have been demonstrated.

The objectives of this research were to evaluate prevalence and degree of steatosis in patients with type 2 diabetes and the metabolic syndrome (defined by ATP III criteria); to search for metabolic factors which are predictive for the degree of steatosis, and to evaluate the possible link between hepatic steatosis and anatomic vasculopathy (intima-media thickness – IMT and carotid plaques) and endothelial function (flow mediated dilation - FMD).

An observational study was performed among 60 type 2 diabetic patients (M/F 25/35) with metabolic syndrome afferent to our Diabetes Center. Steatosis was evaluated by means of semi-quantitative ecography (4 grades) as well as by an “objective quantitative” method based on the determination of liver/kidney ratio (6 grades). The presence of carotid plaques and the IMT measurement were evaluated by means of ecocolor Doppler of the supra-aortic arteries. The endothelial function was evaluated by means of ecography as the vasodilatation induced by ischemia in the brachial artery (FMD). We measured anthropometric variables (body mass index, waist circumference), metabolic parameters (lipids, HbA1c, HOMA), inflammation markers

(hs-PCR, IL-6, TNF α), thrombogenic factors (fibrinogen) and an adipokine (leptin). We applied a statistical program (Ordered Probit) to evaluate the probability to predict the degree of steatosis by the combination of metabolic parameters.

The prevalence of steatosis was 88% (33% mild steatosis, 33% moderate e 22% severe). IMT was 0.88 ± 0.23 mm; 63% of patients had carotid plaques. FMD (calculated in 45 patients) was reduced with respect to normal values (5.02 ± 1.81 %). We demonstrated a correlation between the degree of steatosis and BMI, waist, the number of metabolic syndrome's factors, sex, diastolic pressure, insulinemia, HOMA, Hb1Ac, HDL-cholesterol (inverse), hs-PCR, fibrinogen, leptin. We didn't demonstrate any correlation between steatosis, and medium and maximum IMT, the presence of carotid plaques and FMD. With multiple regression analysis HOMA and BMI levels were independent factors which predict hepatic steatosis (p 0.033). Using the combination of HbA1c, waist and insulinemia, a prediction of the exact grade of steatosis (\pm one steatosis grade) (evaluated by ecography) was obtained in 96.5% of cases.

This study confirms that, in this population of diabetic patients with metabolic syndrome, NAFLD can be considered the hepatic manifestation of the syndrome since it correlates with HOMA and obesity. A high prevalence of increased IMT and of presence of carotid plaques, as well as a reduced FMD compared to general population, are also demonstrated, although they are not apparently linked with steatosis.

INTRODUZIONE

DEFINIZIONE NAFLD (Non Alcoholic Fatty Liver Disease)

La steatosi epatica non alcolica (NAFLD) si caratterizza per la presenza di steatosi epatica in soggetti con anamnesi negativa per assunzione alcolica significativa. Il limite alcolico imputabile di danno epatico è variabile in base a sesso, età e razza; è stato comunque definito un limite di 20 gr/die (in alcune classificazioni si differenzia in 30 gr/die per i maschi e 20 gr/die per le femmine) (1). Le alterazioni anatomopatologiche della NAFLD sono simili a quelle indotte dall'abuso alcolico e possono spaziare dalla semplice steatosi, alla steatosi con elementi infiammatori (steatoepatite, NASH), alla fibrosi avanzata fino alla cirrosi e al carcinoma epatocellulare.

Per steatosi epatica si intende l'accumulo di lipidi, generalmente costituiti da trigliceridi, all'interno dell'epatocita; l'accumulo viene considerato non patologico se inferiore al 5% del peso del fegato (2).

La steatosi è generalmente causata da una serie di alterazioni del metabolismo lipidico su base tossica, dismetabolica, nutrizionale o ereditaria; bisogna distinguere quindi queste forme secondarie dalla forma primitiva (NAFLD propriamente detta) (Tabella 1).

CLASSIFICAZIONE EZIOLÓGICA	ASSOCIAZIONI
NAFLD primaria	Obesità, diabete mellito tipo 2, dislipidemia, ipertensione
NAFLD secondaria	Farmaci: corticosteroidi, estrogeni, amiodarone, tamoxifene, calcio-antagonisti, methotrexate, acido valproico
	Virus: HCV, HIV
	Tossici: solventi, funghi tossici
	Nutrizionale: bypass digiuno-ileale, resezione intestinale, nutrizione parenterale totale, rapido calo ponderale
	Metabolica: lipodistrofia, ipobetalipoproteinemia, ipopituitarismo, sdr Reye, steatosi acuta della gravidanza

Tabella 1: Classificazione eziologica della NAFLD

La NAFLD primitiva è frequentemente associata ad obesità (prevalentemente viscerale), diabete e dislipidemia, ed è correlata a marcatori clinici e biologici di insulino-resistenza. C'è quindi una forte associazione con la sindrome metabolica ed essa può essere considerata tra le manifestazioni cliniche della sindrome stessa (3). Negli USA e paesi occidentali, paesi nei quali vi è un'alta prevalenza di sindrome metabolica, la NAFLD rappresenta la causa più comune di alterazioni a livello epatico.

La steatosi alcolica è stata considerata per molti anni una patologia benigna, un riscontro occasionale di scarso valore clinico; il quadro di steatoepatite non alcolica (NASH) può però progredire in cirrosi nel 20% dei casi ed è considerata una delle principali cause di cirrosi criptogenetica; mentre la sola steatosi non complicata sembra avere una prognosi benigna nella maggioranza dei pazienti (4-5).

EPIDEMIOLOGIA

La reale prevalenza della NAFLD non è nota per la mancanza di test diagnostici specifici e sensibili utilizzabili su larga scala. Le stime di prevalenza vengono infatti dedotte da criteri indiretti (rialzo delle transaminasi, steatosi epatica all'ecografia). La NAFLD è presente in tutte le razze e le fasce d'età. In alcune casistiche sembra essere più frequente nei maschi, in altri studi nelle femmine; uno studio cinese ha rilevato che nelle fasce d'età < 50 anni la prevalenza di NAFLD nelle donne è circa la metà che negli uomini per probabile effetto protettivo degli estrogeni, dopo la menopausa aumenta la prevalenza superando anche quella dei maschi (6). Nella popolazione generale la prevalenza è del 10-24% (7). Aumenta in relazione all'obesità, in uno studio italiano è stato evidenziato che la prevalenza di NAFLD, diagnosticata con l'ecografia, varia dal 16% in soggetti con BMI < 25 kg/m², al 76% in soggetti obesi con BMI > 30 kg/m² (8). Nelle casistiche di chirurgia bariatrica i soggetti presentano una prevalenza di NAFLD del 96% (9). Aumenta inoltre in relazione ai gradi di iperglicemia: 27% (glicemia a digiuno < 110 mg/dl), 43% (glicemia a digiuno 110-126 mg/dl), 62% (glicemia a digiuno > 126 mg/dl, in diabete di nuova diagnosi) (10). Inoltre, l'associazione tra diabete ed obesità pone un rischio ulteriore: tra i

pazienti con obesità severa e diabete, il 100% ha almeno una lieve steatosi, il 50% ha steatoepatite ed il 19% ha cirrosi (11).

La prevalenza della NAFLD è in aumento perché sono in aumento alcuni fattori di rischio importanti come il diabete di tipo 2 e l'obesità. Ad esempio in uno studio giapponese che considerava una popolazione di 39000 persone circa con diverse cause di epatopatia, la prevalenza di steatosi epatica all'ecografia è aumentata dal 12,6% nel 1989, al 30,4% nel 1998, fino al 28,4% nel 2000 (12).

Infine, più recentemente Targher ed al. (13) hanno riscontrato che in una popolazione di diabetici di tipo 2 (3166 pazienti) solo il 14,7% non presenta steatosi alla diagnosi ecografica, la maggioranza invece (2421 pazienti) ha una qualche anomalia ecografia o elevati enzimi epatici. Di questi 2421 pazienti, il 12,6% abusa di alcool (>20 g/die), il 3,1% soffre di altre epatopatie croniche (virali, da farmaci ecc) e ben il 69,5% è affetto da NAFLD.

STORIA NATURALE

La NAFLD è stata considerata a lungo una condizione benigna, rappresenta però un fattore di rischio per patologie epatiche più gravi che portano alla fibrosi e alla steatoepatite non alcolica (NASH). Circa il 10% dei pazienti con NAFLD evolve in NASH che a sua volta può progredire in cirrosi, morte per cause epatiche ed epatocarcinoma rispettivamente nel 25%, 10% e 1% dei casi (5-7).

La NAFLD sembra comunque essere a lenta progressione, con una minoranza di pazienti affetti che presenterà morbilità e morbidità patologia-correlata (14).

Dagli studi longitudinali i principali fattori di rischio per la progressione a fibrosi sono l'età, l'insulino-resistenza e le patologie ad essa correlate (diabete, obesità, ipertrigliceridemia) (15). Nelle fasi avanzate vi è una sovrapposizione tra causa (insulino-resistenza) ed effetto (fibrosi), la cirrosi infatti induce di per sé insulino-resistenza (16). L'insorgenza e la progressione della fibrosi è più frequente tra i pazienti con steatoepatite rispetto a semplice steatosi.

FISIOPATOLOGIA DELL'ACCUMULO DI GRASSI NEL FEGATO

La patogenesi della NAFLD non è stata ancora del tutto chiarita. Alcuni Autori propongono che l'insulino-resistenza svolga un ruolo chiave portando alla steatosi epatica da una parte e dall'altra facilitando la progressione in steatoepatite. Altri autori hanno proposto la teoria dei "due colpi", cioè accanto ad una degenerazione grassa del fegato (primo colpo) ci deve essere un altro insulto ossidativo (secondo colpo) per far progredire la semplice steatosi in NASH (17).

Il deposito di ferro a livello epatico, la leptina, la sovracrescita batterica ed il calo delle difese anti-ossidanti sono stati studiati come possibili agenti ossidativi.

Ruolo dell'insulino-resistenza

L'insulino-resistenza induce cambiamenti importanti nel metabolismo lipidico quali un aumento della lipolisi periferica, aumentata sintesi di trigliceridi e aumentata captazione (uptake) di acidi grassi da parte del fegato (18). Tutte queste condizioni contribuiscono all'accumulo di trigliceridi nell'epatocita. I trigliceridi derivano dagli acidi

grassi accumulati nel tessuto adiposo e dalla lipogenesi de novo che avviene a livello epatico. Normalmente, gli acidi grassi vengono esterificati a livello epatico in trigliceridi, alcuni dei quali sono poi trasportati fuori dagli epatociti come very-low-density lipoproteins (VLDL). L'aumento dei livelli di lipidi (in particolare sotto forma di trigliceridi) all'interno delle cellule epatiche di pazienti con NAFLD risulta da uno squilibrio tra gli enzimi che promuovono l'entrata e la sintesi di acidi grassi e quelli che promuovono l'ossidazione e l'uscita degli acidi grassi (11).

L'insulino-resistenza (stimolata da $\text{TNF}\alpha$, Rad, PC-1, leptina e acidi grassi) porta ad un accumulo di grasso nel fegato con due sistemi: la lipolisi e l'iperinsulinemia. La lipolisi induce un aumento della quantità di acidi grassi liberi nel sangue provenienti dal tessuto adiposo e di conseguenza un aumento dell'uptake epatico di acidi grassi. L'aumento degli acidi grassi a livello degli epatociti porta ad uno shift tra l'ossidazione dei carboidrati e la β -ossidazione degli acidi grassi, una saturazione della β -ossidazione comporta un accumulo intraepatico di grasso. Gli acidi grassi sono inoltre substrati e induttori dei citocromi P450 (in particolare 2E1 e 4A). Quest'ultimo tende ad essere elevato nei pazienti con NAFLD e porta ad un aumento dei radicali liberi dell'ossigeno capaci di indurre la perossidazione dei lipidi di membrana. L'iperinsulinemia (secondaria all'insulino-resistenza) induce a livello epatico un aumento della glicolisi e successiva conversione dei carboidrati in FFA (trigliceridi) e favorisce l'accumulo di trigliceridi all'interno degli epatociti in quanto porta ad una aumentata distruzione della proteina B-100, essenziale per la costituzione delle VLDL.

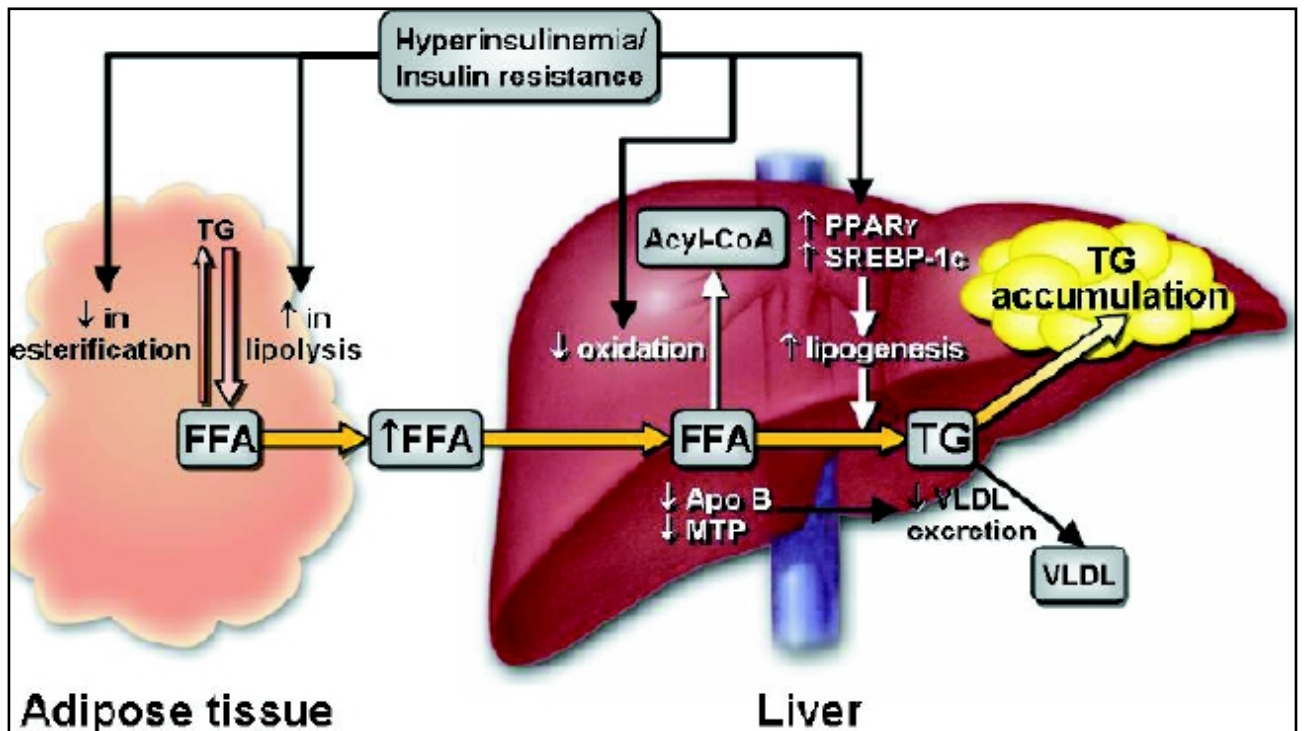


Figura 1: Ruolo dell'insulino-resistenza nella steatosi epatica. L'insulino-resistenza a livello del tessuto adiposo stimola la lipolisi e inibisce l'esterificazione degli acidi grassi liberi (FFA), questo determina un'aumentata concentrazione sierica di FFA che vengono captati dal fegato e utilizzati per la sintesi di trigliceridi. L'iper-accumulo di trigliceridi nel fegato è secondario all'aumentato afflusso di FFA e all'iper-espressione di fattori di trascrizione lipogenici (PPAR γ -peroxisome proliferator-activated receptor gamma e SREBP1c-sterol regulatory element binding protein). L'iperinsulinismo inoltre inibisce l'ossidazione degli FFA e lo smaltimento dei trigliceridi sotto forma di VLDL per ridotta sintesi di apo B o ridotta incorporazione di trigliceridi con apo B da parte di MTP-microsomal triglyceride transfer protein. (tratto da Adams LA, Angulo P, Lindor KD. Nonalcoholic fatty liver disease. CMAJ. 2005;172(7):899-905.) (18).

Ruolo dello stress ossidativo

L'accumulo di grasso negli epatociti provoca saturazione della β -ossidazione mitocondriale (l'iperinsulinemia stessa è in grado di bloccare la β -ossidazione mitocondriale). Quindi se c'è un aumentato afflusso di acidi grassi diventano

importanti i sistemi extra-mitochondriali di ossidazione: β -ossidazione perossisomiale (in genere deputata all'ossidazione di acidi grassi a catena molto lunga) e la ω -ossidazione microsomiale (ad opera degli enzimi 2E1 e 4 del citocromo P450 con produzione di acidi grassi dicarbossilici particolarmente tossici per la cellula); entrambe determinano la liberazione di H_2O_2 ed altre specie reattive dell'ossigeno. Le lipossigenasi perossisomiali e microsomiali di questi processi extramitochondriali sono regolate da particolari recettori cellulari PPAR α (dopo il loro legame con gli Acil-CoA non metabolizzati). L'accumulo intraepatocitario di acidi grassi rappresenta una fonte di stress ossidativo responsabile dell'evoluzione da semplice steatosi alla steatoepatite e alla cirrosi.

Quando le specie reattive dell'ossigeno superano le capacità difensive dei sistemi antiossidanti possono indurre steatoepatite e fibrosi tramite perossidazione lipidica e induzione di citochine. L'iperproduzione di specie reattive può indurre danno a livello mitocondriale (danno al DNA, alle proteine ed alle membrane costitutive) con alterazione della produzione cellulare di ATP e rilascio ulteriore di metaboliti reattivi dell'ossigeno. La perossidazione lipidica delle membrane cellulari provoca necrosi cellulare, formazione della sostanza ialina di Mallory ed attivazione delle cellule epatiche stellate che sintetizzano collagene. Lo stress ossidativo induce la formazione di citochine come il $TNF\alpha$, $TGF\beta$ e IL8 da parte di epatociti, cellule di Kupffer e adipociti. Queste citochine provocano apoptosi, chemiotassi leucocitaria, fenomeni di flogosi locale con ulteriore danno alla catena respiratoria mitocondriale. I mitocondri in corso di steatoepatite presentano danni ultrastrutturali con inclusioni paracrystalline e megamitocondri.

I mitocondri sono strutture intracellulari fondamentali per il metabolismo che servono per la produzione di energia della cellula. È stato dimostrato che anomalie

mitocondriali sono fortemente legate alla patogenesi della NAFLD e tali dati supportano la teoria che la NAFLD sia una malattia mitocondriale (19). La disfunzione mitocondriale però non è solo causa di accumulo di grasso a livello epatico, ma porta anche alla generazione di ROS e di citochine che contribuiscono alla progressione della NAFLD inducendo infiammazione e fibrosi epatica.

Ruolo delle adipochine e delle citochine infiammatorie

Il tessuto adiposo è un organo endocrino attivo che secreta le adipochine che sembrano avere un ruolo importante come legame patogenetico tra obesità, insulino-resistenza e steatosi epatica. Il ruolo delle adipochine e delle citochine sembra centrale inoltre nella progressione della steatosi, verosimilmente mediata dallo stress ossidativo. Un ruolo fondamentale di tali molecole è stato evidenziato anche nella genesi dell'aterosclerosi. Non sono però univoci i risultati dei vari studi che hanno valutato le correlazioni tra le diverse adipochine/citochine con i quadri patologici su menzionati.

La leptina è un sensore di massa grassa, viene codificato dal gene *ob*, è prodotta principalmente dal tessuto adiposo e si lega ai recettori ipotalamici con effetto anoressizzante e termogenico. La leptina previene l'accumulo lipidico nei tessuti non adiposi quali miocardio, muscolo scheletrico, fegato e pancreas attraverso la modulazione della β -ossidazione (20-21). Le concentrazioni plasmatiche di leptina sono correlate positivamente con il grado di obesità sia totale sia viscerale; vi è comunque ampia oscillazione dei livelli anche a parità di massa grassa (22). La leptinemia è maggiore nelle femmine indipendentemente dall'adiposità. Il metabolismo della leptina è in relazione con la secrezione e l'azione dell'insulina; spesso vi è

resistenza all'azione sia dell'insulina sia della leptina che comporta accumulo di trigliceridi a livello epatico. L'infusione di leptina nei topi riduce il grasso viscerale e l'accumulo di trigliceridi, promuove l'azione insulinica a livello epatico senza interferire con la concentrazione di FFA e con la captazione periferica del glucosio (23). Questi effetti benefici non dipendono solamente dall'aumento dell'insulino-sensibilità, ma anche dall'azione della leptina in sé. A seconda degli studi i livelli di leptina sono stati descritti come aumentati (24) o diminuiti (20) nei pazienti con NAFLD. L'iperleptinemia che si riscontra nei pazienti con NAFLD sembra secondaria alla leptino-resistenza nei tessuti periferici (25). E' stato dimostrato inoltre che la leptina potrebbe avere un effetto profibrogenico a livello dei sinusoidi favorendo la progressione della steatosi in fibrosi (26). In pazienti obesi e diabetici tipo 2 i livelli di leptinemia sono risultati ridotti se confrontati con quelli di pazienti solo obesi con simile grado di insulino-resistenza; tale risultato sembra quindi essere correlato non all'obesità o insulino-resistenza ma alla ridotta e alterata pulsatilità fisiologica della secrezione insulinica (27).

Uno studio coreano ha evidenziato che il grado di steatosi (determinato ecograficamente) correla con i livelli di leptina, non vi è invece relazione con adiponectina e resistina (28). Diversi invece i risultati di un recente studio spagnolo che ha correlato i gradi di steatosi (determinati istologicamente) con le adipochine e l'insulino-resistenza; l'adiponectina e la resistina correlano con la steatosi, non si rileva invece aumento di leptina e TNF α all'aumentare dell'entità della steatosi (29).

E' stato evidenziato dal confronto di pazienti grandi obesi con e senza insulino-resistenza che in quelli con insulino-resistenza vi era una riduzione di adiponectina e un aumento della resistina, non vi erano invece differenze per la leptina (30).

La correlazione tra leptina e malattie cardiovascolari è tuttora controversa. Uno studio ha evidenziato un'associazione tra leptinemia e spessore medio intimale carotideo in

soggetti giovani, non diabetici, con differenti gradi di obesità; tale associazione sembra mediata dall'obesità scomparendo la correlazione IMT-leptinemia se corretta per BMI (31). Un altro studio italiano che ha valutato soggetti sani ha sottolineato la correlazione tra rapporto leptina/adiponectina con IMT carotideo anche dopo correzione per grado di obesità (32). Uno studio americano su più di 1000 soggetti non diabetici e con anamnesi negativa per malattie cardiovascolari ha valutato il possibile ruolo di insulina e leptina come link tra obesità e fattori di rischio per malattie cardiovascolari (PCR, fibrinogeno); il significato della leptina sembra non essere correlato alla patogenesi delle malattie cardiovascolari secondaria a infiammazione e fattori trombotici (33). Un altro studio effettuato su donne diabetiche ha escluso un'associazione tra livelli di leptina circolante e morbilità e mortalità cardiovascolare (34).

L'adiponectina è un ormone prodotto esclusivamente dal tessuto adiposo con effetti positivi sul metabolismo lipidico in quanto aumenta sia l'entrata dei lipidi all'interno delle cellule sia la β -ossidazione a livello muscolare. Inoltre ha effetti anti-infiammatori in quanto inibisce la produzione del TNF- α a livello epatico. L'adiponectina gioca un ruolo nella modulazione dell'insulino-sensibilità, ha proprietà antiinfiammatorie ed è ridotta nei topi con steatosi (35), in topi ob/ob infatti la somministrazione di adiponectina riduce la steatosi e la fibrosi a livello epatico (36).

Ridotti livelli di adiponectina correlano con la severità dell'istologia in pazienti con NASH (37), l'ipoadiponectinemia è infatti associata con una necro-infiammazione più estesa (38) e con il grado di fibrosi (39), anche l'espressione intraepatica dei recettori dell'adiponectina (che agiscono con azione autocrina o paracrina) sono inversamente correlati alla necro-infiammazione.

L'adiponectina potrebbe avere un ruolo nella modulazione dell'insulino-sensibilità,

poiché la somministrazione di pioglitazone aumenta i livelli di adiponectina che a sua volta correla con il miglioramento nella steatosi epatica, nell'infiammazione e nella fibrosi.

La resistina è una proteina derivata dal tessuto adiposo che potrebbe avere un ruolo importante nell'insulino-resistenza, il dato è confermato nei modelli murini ma non è ancora ben definito nell'uomo (26). L'aumento dell'espressione di questa proteina in un modello murino porta ad intolleranza al glucosio, iperinsulinemia e soppressione dei livelli degli acidi grassi liberi (40). Nuove evidenze indicano inoltre che la resistina possa stimolare il processo infiammatorio (41). I livelli circolanti di resistina e l'espressione dell'm-RNA nel tessuto adiposo sono più elevati nei pazienti con NAFLD, il livello di resistina sierica è inoltre correlato con la severità dell'istologia, infatti la resistina induce un aumento dell'IL-6 e del TNF- α , l'obesità e l'insulino-resistenza periferica non sono associati però associati all'aumento della resistina (42).

La proteina C-reattiva (PCR) è classicamente una proteina di fase acuta che viene prodotta a livello del fegato in risposta a stimoli flogistici. E' stato dimostrato che vi è una produzione di PCR anche negli adipociti del tessuto adiposo umano come risposta a citochine infiammatorie (IL-6, IL-1 β) (43). Ridker ha dimostrato una stretta relazione tra eventi cardiovascolari e PCR, interleukina-6, TNF α , P selectina solubile e molecole di adesione intracellulari solubili (44). Tra queste, la PCR ad alta sensibilità (hs-PCR) si è dimostrato il fattore predittivo di eventi cardiovascolari più potente (45). L'utilizzo della hs-PCR come parametro aggiuntivo nella definizione della sindrome metabolica è stato proposto per rafforzare il potere predittivo sul rischio cardiovascolare e sullo sviluppo di diabete mellito (46). Studi recenti hanno dimostrato un aumento dei livelli di hs-PCR in soggetti con sindrome metabolica rispetto ai controlli; il fattore della sindrome più potentemente associato alla PCR è risultato

essere l'obesità addominale (47), a seguire l'ipertensione arteriosa, l'ipertrigliceridemia e l'iperglicemia (48).

Il ruolo della PCR nel definire il rischio cardiovascolare non è peraltro univoco. In un articolo apparso su Lancet è stato messo in discussione inoltre il ruolo causale della PCR nella sindrome metabolica; la PCR è frequentemente associata a sindrome metabolica, essendo la sua produzione aumentata nell'obesità, ma non avrebbe un ruolo nella patogenesi della sindrome metabolica (49). Alla luce dei molti studi pubblicati sembra comunque importante il ruolo rafforzativo del dosaggio della PCR nei confronti di altri parametri metabolici e marcatori di aterosclerosi.

L'importanza della PCR nella steatosi epatica è stato definito da uno studio giapponese che ha identificato la hs-PCR come marcatore di NASH rispetto a NAFLD, inoltre all'interno della steatoepatite l'aumento della PCR risulta correlato al grado di fibrosi epatica (50).

Lo stress infiammatorio nella seconda fase della patogenesi della NAFLD secondo la teoria dei due colpi, è fondamentale nell'esacerbare l'accumulo di lipidi a livello epatocitario; è stato eseguito un esperimento in vitro e in vivo su ratti in cui la stimolazione indotta dal TNF α e altre citochine ha ulteriormente sregolato il controllo del trasporto lipidico intra ed extraepatico (51).

CLINICA

Dal punto di vista clinico molti pazienti affetti da NAFLD non riferiscono segni/sintomi di epatopatia; i sintomi più comunemente riferiti sono invece astenia, malessere, sensazione di peso a livello dell'ipocondrio destro, dispepsia e nausea.

L'epatomegalia è l'unico reperto obiettivo (variabile tra il 25% e il 75% dei pazienti) tra l'altro non sempre apprezzabile a causa dell'obesità addominale.

Le stigmati cliniche di epatopatia cronica oppure di cirrosi (come la ginecomastia, il caput medusae, l'atrofia muscolare, l'ittero) sono abbastanza infrequenti.

Un'alta percentuale di soggetti con cirrosi criptogenica presenta molte delle caratteristiche epidemiologiche e demografiche di pazienti con NAFLD suggerendo che questa condizione possa essere una NAFLD misconosciuta (52).

PARAMETRI BIOUMORALI

I reperti di più frequente riscontro sono un aumento di ALT, AST oppure di entrambe. Il rapporto AST/ALT è spesso < 1 (53), anche se questo rapporto tende ad aumentare con l'avanzare della fibrosi portando ad una perdita di accuratezza in pazienti con cirrosi. Generalmente le transaminasi non superano di 2-3 volte il limite superiore di normalità e la maggior parte dei pazienti ha valori normali. Non vi è correlazione tra valore delle transaminasi e classificazione istologica (54).

La γ GT, la fosfatasi alcalina e l'albumina sono generalmente normali. Dal 10 al 15% dei pazienti presenta un aumento della bilirubina totale; l'ipergammaglobulinemia è stata notata invece nel 30% circa di questi pazienti e la presenza di anticorpi antinucleo è stata dimostrata dal 12% al 40% dei pazienti con NAFLD.

La ferritina sierica tende ad essere aumentata in circa la metà dei pazienti e l'aumento della saturazione della transferrina è presente tra il 6 e l'11%. L'indice di ferro epatico e la sideremia sono spesso compresi nel range di normalità. È stato anche proposto che l'eterozigosi per il gene dell'emocromatosi (HFE) potrebbe essere aumentato in

soggetti con NAFLD (anche se soggetti omozigoti per questo gene non hanno un aumentato rischio di maturare NAFLD) e che un aumento di ferro a livello epatico potrebbe essere correlato con la severità dell'epatopatia (11).

E' fondamentale distinguere la NAFLD dall'epatopatia alcolica: non esiste un metodo laboratoristico sicuro anche se spesso nella epatopatia alcolica il rapporto AST/ALT (AAR) è > 1 e il rapporto tra transferrina saturata e totale ha una sensibilità dell'81% ed una specificità del 98% per la diagnosi differenziale tra queste due condizioni (52).

Un altro aspetto fondamentale è quantificare il grado di fibrosi nella NAFLD con metodi non invasivi. L'associazione tra aumento delle transaminasi e la fibrosi sembra essere inconsistente. Invece, il rapporto AST/ALT (AAR) sembra per ora il migliore indice per escludere la fibrosi avanzata in pazienti con NASH e per predirne la sua presenza. Infine, la ferritina sierica è risultata aumentata in una percentuale di pazienti con NAFLD tra il 20 ed il 40% e sembra essere correlata anche con il grado di insulino-resistenza e di danno epatico. Sono comunque necessari ulteriori studi per confermare l'utilità di questo marker.

DIAGNOSTICA PER IMMAGINI

La diagnosi di steatosi può essere effettuata con metodiche di imaging quali ecografia, TC e RMN e con metodiche più invasive come la biopsia epatica.

Da un punto di vista ecografico il fegato steatosico si contraddistingue per un'accentuata "brillantezza" (bright liver), che è dovuta ad aumento dell'ecogenicità (evidente dal confronto tra il parenchima epatico e la corticale renale), per l'attenuazione del fascio ultrasonoro, per la perdita di risoluzione dei dettagli strutturali

intraepatici, per la perdita di definizione del diaframma e l'impossibilità di distinguere la vena porta. La presenza di vacuoli intracitoplasmatici di grasso determina un incremento delle interfacce e spiega da un punto di vista fisico l'aumento dell'ecogenicità parenchimale.

Sulla base dei parametri ecografici i gradi di steatosi sono così distinti:

Grado 0: Ecogenicità normale, non vi sono differenze tra ecogenicità del parenchima epatico e corticale del rene (Figura 2).



Figura 2: Ecogenicità normale

Grado 1: Steatosi lieve, presenza del solo incremento dell'ecogenicità del parenchima epatico rispetto alla corticale renale senza significativa attenuazione del fascio ultrasonoro. In questo caso il parenchima rimane ben esplorabile anche in profondità (Figura 3).

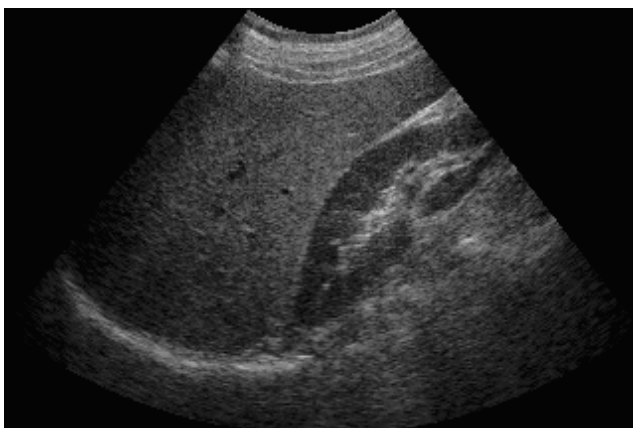


Figura 3: Steatosi lieve

Grado 2: Steatosi moderata, incremento dell'ecogenicità del parenchima epatico associata ad attenuazione del fascio ultrasonoro in profondità ma con diaframma ancora ben visibile lungo il contorno profondo del fegato. Non sono più distinguibili le pareti dei vasi (Figura 4).



Figura 4: Steatosi moderata

Grado 3: Steatosi grave, aumento marcato dell'ecogenicità del parenchima con attenuazione marcata del fascio ultrasonoro in profondità tale da rendere non più evidente il dettaglio vascolare, la biforcazione portale all'ilo, il diaframma (Figura 5).

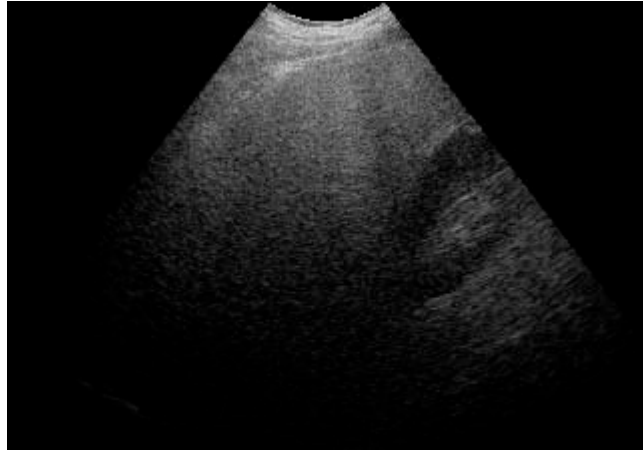


Figura 5: Steatosi grave

Talvolta la steatosi non interessa in maniera diffusa il parenchima epatico ma può localizzarsi solo in alcuni settori del fegato realizzando il quadro della cosiddetta “steatosi focale” che spesso entra nella diagnosi differenziale con le alterazioni “focali” del fegato.

La sensibilità dell’ecografia aumenta con l’aumentare del grado di steatosi. Si è calcolato che la quota di grasso necessaria per avere una buona sensibilità debba essere almeno del 33% (100% di sensibilità, con un valore predittivo positivo del 62%) (55).

La TC senza mezzo di contrasto appare essere la più accurata delle tecniche per identificare e caratterizzare la steatosi epatica. La sensibilità della TC risulta ottima per un grado di steatosi maggiore del 33% (sensibilità 93%, valore predittivo positivo 76%) (55), anche se non vi sono molti studi al riguardo per i limiti legati alla elevata esposizione a radiazioni intrinseca alla metodica stessa.

All’indagine TC risulta esservi una minore attenuazione ai raggi X nel fegato steatosico rispetto al normale misurata in termini di unità Hounsfield. E’ stata valutata anche l’attenuazione del fegato rispetto a quella della milza con dimostrazione di una buona correlazione inversa tra entrambi questi indici e il grado istologico della steatosi

(56). La quantificazione TC in unità Hounsfield non correla però con il grado istologico di fibrosi.

In RMN la steatosi appare come un segnale di intensità elevata nelle immagini T1-pesate. Nella pratica clinica tuttavia, si utilizza soprattutto il confronto tra le immagini in fase ed in contrasto di fase. In questo modo è possibile misurare la frazione di grasso, con una buona correlazione al confronto con l'istologia quando la steatosi è presente in grado discreto. Una tecnica ulteriore, la risonanza magnetica spettroscopica (MRS), permette di esaminare le frequenza di risonanza di tutte le specie protoniche all'interno di una regione di interesse, con una maggiore sensibilità alle quote minori di grasso per quanto questa metodica tenda alla sovrastima (57).

I limiti di tale metodica sono legati soprattutto al suo costo elevato e alla sua scarsa tollerabilità da parte di un discreto numero di pazienti, pertanto l'ecografia rimane per parecchi autori l'indagine più disponibile, economica e sicura (58).

Al momento attuale non vi sono metodiche di imaging in grado di differenziare la steatoepatite dalla semplice steatosi. L'unica metodica in grado di evidenziare la NASH è la biopsia epatica, che però rimane un'indagine non priva di qualche rischio (59).

Dal punto di vista anatomo-patologico le caratteristiche della NAFLD includono: steatosi, fibrosi, infiltrato infiammatorio misto, rigonfiamento e necrosi epatocitaria, corpi di Mallory, nuclei vacuolati e stipati di glicogeno, siderosi. Queste alterazioni possono essere variamente rappresentate e associate; Kleiner ha proposto una stadiazione che valuta il grado secondo un "NAFLD Activity Score" (NAS) assegnando un punteggio separato per entità steatosi, ballooning epatocitario e infiammazione lobulare, e lo stadio in base all'entità della fibrosi (Tabella 1) (60).

NAFLD Activity Score (NAS) (0-8) Sum of scores for steatosis, lobular inflammation and hepatocellular ballooning	
Steatosis (0-3)	
0 = <5% hepatocytes involved	
1 = 5-33% hepatocytes involved	
2 = 33-66% hepatocytes involved	
3 = >66% hepatocytes involved	
Lobular Inflammation (0-3)	
0 = none	
1 = <2 foci per ×200 field	
2 = 2-4 foci per ×200 field	
3 = >4 foci per ×200 field	
Hepatocyte ballooning (0-2)	
0 = none	
1 = few ballooned cells	
2 = many cells/prominent ballooning	
Correlation between total NAFLD activity scores and an overall histological diagnosis of steatohepatitis	
NAFLD activity score	Histological diagnosis of steatohepatitis
≥5	Probable or definite NASH
3-4	Uncertain
≤2	Not NASH
Fibrosis stage	
1 Perisinusoidal or periportal	
1A Mild, zone 3, perisinusoidal	
1B Moderate, zone 3, perisinusoidal	
1C Portal/periportal fibrosis only	
2 Perisinusoidal and portal/periportal fibrosis	
3 Bridging fibrosis	
4 Cirrhosis	

Tabella 1: Classificazione istologica della NAFLD
(Da Kleiner DE et al. Hepatology 2005)

DIAGNOSI

La diagnosi di epatopatia steatosica non alcolica è spesso sospettata in persone con aumento degli enzimi epatici, reperti ecografici di steatosi epatica oppure epatomegalia non spiegata da altra causa. Il gold standard per la diagnosi di NAFLD è la correlazione clinico-patologica con la conferma di steatosi attraverso la biopsia epatica e l'esclusione clinica di altre cause (in particolare il consumo di alcol ed altri agenti epatotossici) (61).

Una accurata anamnesi (mirata ad escludere l'abuso di alcol e farmaci) ed un esame obiettivo dettagliato sono essenziali. Il limite di alcol stimato necessario per causare una epatopatia alcolica è di circa 20 grammi per giorno per le femmine e 30 per i maschi, sebbene tali valori siano influenzati da età, genere, stato nutrizionale e la presenza di altre condizioni (ad esempio l'obesità). Perciò è spesso difficile escludere il ruolo dell'alcol nella patogenesi della steatoepatite.

Devono essere escluse inoltre altre cause di epatopatia come forme virali, autoimmuni, fattori metabolici oppure ereditari, farmaci o tossine. Da ciò deriva che spesso la NAFLD è una diagnosi di esclusione.

La biopsia epatica gioca un ruolo fondamentale per confermare o meno la diagnosi di NAFLD in quanto è la tecnica più sensibile e specifica ed in grado di fornire informazioni di tipo prognostico. La biopsia è anche utile per verificare l'effetto del trattamento medico in quanto la correlazione tra danno istologico e tecniche di imaging è scarsa.

Nei pazienti affetti da NAFLD vi sono alcuni fattori, quali un'età superiore a 45 anni, la concomitante presenza di obesità e di diabete mellito tipo 2 ed un rapporto AST/ALT > 1, che sono indicatori di fibrosi epatica. In questi pazienti è più utile eseguire la biopsia epatica ai fini prognostici e per definizione della fibrosi.

Tale procedura è però spesso non praticata in quanto la biopsia rappresenta solo una piccola porzione di fegato (circa 1/50000) e ciò può portare ad errori di campionamento. Inoltre è stata notata una certa variabilità di interpretazione tra anatomo-patologi. Infine, la biopsia è affetta da una morbilità (con complicanze serie intorno all'0,3%) e da una mortalità intorno all'0,01% (11-61).

TERAPIA

Una terapia eziologica della NAFLD non esiste. Gli interventi terapeutici mirano a migliorare l'insulino-resistenza, che è alla base della sindrome metabolica, tipica di questi soggetti. Primo fra tutti è l'intervento sullo stile di vita che comporta una diminuzione dell'introito calorico associato ad un aumento dell'attività fisica finalizzati ad ottenere un calo ponderale. Un calo ponderale del 5-10% è in grado di indurre una riduzione delle transaminasi e del volume epatico, un calo ponderale troppo veloce (maggiore di 1,6 kg/settimana) invece peggiora il quadro epatico in quanto promuove una mobilizzazione massiva dei grassi dal tessuto adiposo (per attivazione della lipolisi) che arrivano direttamente al fegato attraverso la vena porta.

L'esercizio fisico (aerobico) aumenta la sensibilità insulinica e migliora l'utilizzo dei substrati a livello muscolare. La perdita di peso e l'esercizio fisico aumentano in modo significativo i livelli di adiponectina, riducono i livelli di leptina ed aumentano l'insulino-sensibilità in soggetti obesi (62).

Se sono presenti iperglicemia e/o dislipidemia (caratteristici della sindrome metabolica) si devono trattare questi fattori con la somministrazione di farmaci insulino-sensibilizzanti come la metformina ed i tiazolidinedioni (TZD) e con la somministrazione di statine laddove necessario.

La metformina diminuisce la neoglucogenesi, diminuisce l'assorbimento di zuccheri a livello gastro-intestinale e aumenta l'insulino-sensibilità, riduce la ~~la~~ -ossidazione mitocondriale e riduce la steatosi grazie all'azione inibitoria sul TNF- α . È stato visto che nei topi questo farmaco ha anche un ruolo nel ridurre la lipogenesi epatica, le transaminasi epatiche e la progressione della NAFLD, mentre aumenta l'ossidazione di acidi grassi sempre a livello epatico (63). La metformina rispetto a terapia dietetica riduce le transaminasi, normalizzandole nel 55% dei casi (64).

I TZD si legano al recettore PPAR γ ed aumentano l'insulino-sensibilità facilitando il deposito di trigliceridi negli adipociti ed impedendo il deposito di trigliceridi nel fegato e nel muscolo. I TZD indirettamente inducono un miglioramento della sensibilità insulinica attraverso l'aumento della adiponectina e hanno anche attività anti-infiammatoria.

Uno studio di Belfort ha rilevato che l'utilizzo di pioglitazone migliorando l'insulino-resistenza induce riduzione delle transaminasi, della steatosi e della necroinfiammazione; l'effetto a lungo termine rimane però incerto (65).

L'assunzione degli insulino-sensibilizzanti (metformina e TZD) induce una riduzione/normalizzazione delle transaminasi, ma tale effetto è reversibile alla sospensione del farmaco.

Tra i farmaci antiipertensivi, il losartan migliora i markers epatici di fibrosi epatica ed i livelli di ALT (66).

Ultimamente è stato proposto l'uso di exenatide per il trattamento del diabete tipo 2, ma anche per migliorare la funzione epatica in soggetti con NAFLD. L'exenatide, in vitro, innalza il livello di PPAR γ , un elemento chiave nella β -ossidazione di acidi grassi e nella down-regulation della SREBP-1c e della SCD-1 entrambi elementi chiave nella lipogenesi de novo a livello epatico. Tali effetti inducono una riduzione dell'accumulo di grasso a livello epatico oltre ad avere un'azione contro l'insulino-resistenza tipica di questi soggetti (67).

L'efficacia dell'acido ursodesossicolico è controversa; sembrerebbe avere effetto antiossidante e ridurre il danno di membrana negli epatociti comportando una riduzione delle transaminasi e un miglioramento del quadro istologico (68); un studio successivo ha invece evidenziato il mancato effetto positivo su fibrosi e necroinfiammazione (69).

NAFLD COME FATTORE DI RISCHIO CARDIOVASCOLARE

La NAFLD sembra essere collegata ad una maggior incidenza di alterazioni cardiovascolari a livello sub-clinico (ispessimento intima-media a livello carotideo e diminuita risposta della vasodilatazione dell'arteria brachiale dopo stimolo ipossico o nitrati) (70), a livello macroangiopatico (lesioni aterosclerotiche a carico delle arterie coronarie, cerebrali e delle arterie periferiche) (71) ed infine anche a livello microangiopatico (nefropatia e retinopatia) (72).

La NAFLD è spesso associata ad obesità, diabete mellito tipo 2, dislipidemia, insulino-resistenza che insieme vanno a comporre la sindrome metabolica. Questo sottolinea fortemente il fatto che la NAFLD possa essere la manifestazione epatica dell'insulino-

resistenza che sta alla base della sindrome metabolica, quest'ultima riconosciuta da tempo come fattore di rischio cardiovascolare.

Si avanza pertanto l'ipotesi, che necessita ancora di approfondimenti, che la presenza di NAFLD in diabetici di tipo 2 possa essere legata ad un aumentato rischio di malattie cardiovascolari indipendentemente dai vari fattori della sindrome metabolica (73).

NAFLD e vasculopatia sub-clinica

La misurazione dello spessore medio-intimale (IMT) della parete arteriosa, in particolare a livello della carotide, è stato utilizzato e validato come marcatore subclinico di aterosclerosi nello studio ARIC (74). E' stato dimostrato che l'ispessimento medio-intimale è associato ad un aumentato rischio di malattie cardio e cerebrovascolari (75). L'IMT è strettamente correlato alla sindrome metabolica (76), all'età (77), al fumo (78), all'ipertensione arteriosa (79). L'IMT correla con l'insulino-resistenza, indipendentemente dagli altri fattori di rischio cardiovascolari, avvalorando il ruolo delle alterazioni metaboliche (insulino-resistenza) nell'accelerare il processo aterogenetico (80).

La NAFLD sembra essere legata ad un aumento dell'IMT carotideo. Inoltre, è stato visto che la severità istologica della NAFLD correla in modo indipendente dai classici fattori di rischio cardiovascolari con l'IMT. Studi precedenti (81) avevano indicato che un valore intima-media inferiore a 0,86 mm attribuiva un basso rischio cardiovascolare mentre un valore maggiore di 1,10 era predittivo di un rischio elevato. Altri studi hanno dimostrato che i pazienti con NAFLD hanno un valore medio di IMT intorno ai 1,14 mm, rispetto alla popolazione generale che ha un valore pari a 0,82. Inoltre soggetti con NAFLD tendono ad avere una maggior quantità di placche aterosclerotiche (50% in più) rispetto ai controlli (82).

Un importante ruolo nella genesi dell'aterosclerosi è stato attribuito all'endotelio, le cui alterazioni funzionali e strutturali sono indispensabili perché si instauri la malattia, in quanto l'endotelio intatto è non trombogenico. Il monossido d'azoto (NO) è il principale mediatore ad azione vasorilassante prodotto dall'endotelio e svolge un ruolo chiave nel mantenimento del tono e della reattività vascolare. Oltre ad essere il principale determinante del tono vascolare basale delle cellule muscolari lisce, l'NO antagonizza l'azione dei vasocostrittori endoteliali, inibisce l'attivazione delle piastrine e dei leucociti e mantiene le cellule muscolari lisce della parete vascolare in stato non proliferativo. L'NO viene sintetizzato a partire dalla L-arginina per l'azione dell'enzima NO sintasi (NOS). L'attivazione e la disfunzione endoteliale sono alterazioni funzionali dell'endotelio, che appare ancora anatomicamente integro e sono potenzialmente reversibili. L'attivazione endoteliale può essere scatenata da vari fattori, quali l'ipertensione, l'ipercolesterolemia, il fumo, che inducono un'aumentata produzione di NFkB (fattore nucleare kB) con conseguente aumentata trascrizione di geni proinfiammatori che determinano uno stimolo alla produzione di molecole di adesione (ICAM e VCAM) (83). Il termine disfunzione endoteliale implica uno squilibrio tra vasodilatazione e vasocostrizione, ovvero una ridotta produzione o disponibilità di monossido d'azoto (NO) e/o un incremento di endotelina-1 e angiotensina e/o una riduzione di sostanze antiossidanti (superossido-dismutasi, catalasi, glutatione-deidrogenasi) (84). Le implicazioni cliniche della disfunzione endoteliale e la sua associazione con gli eventi cardiovascolari e con patologie quali il diabete mellito, la dislipidemia e l'ipertensione arteriosa (85) sono ormai ampiamente dimostrate e possiamo considerare la disfunzione endoteliale un forte predittore, indipendente, di eventi cardiovascolari (86).

La vasodilatazione post-ischemica dell'arteria brachiale (FMD) è la metodica non invasiva che viene utilizzata per la misurazione della funzione endoteliale a livello periferico (87).

E' stato dimostrato che pazienti non diabetici con NAFLD hanno un significativo calo della vasodilatazione endotelio-mediata nell'arteria brachiale (dopo stimolo ipossico) se comparati con soggetti sani e che questa riduzione correla con le caratteristiche istologiche della NAFLD indipendentemente da età, sesso, BMI, indice HOMA ed altri componenti della sindrome metabolica (70).

NAFLD e vasculopatia macroangiopatica

Targher et al. (73) riportano un aumento della prevalenza di vasculopatia coronarica, cerebrale e periferica in pazienti diabetici di tipo 2 con NAFLD paragonati con pazienti diabetici senza NAFLD: la relazione tra NAFLD e malattie cardiovascolari è leggermente diminuita dopo aggiustamento per i classici fattori di rischio cardiocircolatorio, per la durata del diabete e per il controllo glicemico, ed un ulteriore aggiustamento per il rischio dato dalla sindrome metabolica attenua questa relazione. In uno studio prospettico caso-controllo Targher et al (88) hanno dimostrato che dopo gli aggiustamenti per farmaci, fumo, durata del diabete, valori di emoglobina glicata, colesterolo LDL e valori di enzimi epatici, la presenza di NAFLD è significativamente associata con un aumento di rischio cardiovascolare (OR 1,84 che diminuisce a 1,53 se aggiustato per i fattori della sindrome metabolica definiti nell'ATP-III).

La prevalenza di malattia vascolare è aumentata in soggetti con NAFLD e diabete di tipo 2 rispetto ai soggetti senza NAFLD. Si è visto che per quanto riguarda eventi legati alla coronaropatia la prevalenza è del 23% in soggetti con NAFLD rispetto a quelli senza (15,5%), per quanto riguarda la arteriopatia periferica è del 12,8%

(rispetto al 7% della popolazione senza NAFLD) e per quanto riguarda i fenomeni cerebrovascolari è 17,2% contro il 10,2% (73).

NAFLD e microangiopatia

Inoltre, è stato proposto che la NAFLD possa essere un fattore di rischio indipendente anche per le complicanze microvascolari del diabete come la retinopatia e la nefropatia. Infatti, la NAFLD è associata con un aumento di incidenza di retinopatia proliferativa o trattata con laser (OR 1,75) e con un aumento di incidenza di insufficienza renale cronica (OR 1,87) indipendentemente da altri fattori di rischio microvascolare come l'età, il fumo, la durata del diabete, i valori di emoglobina glicata e l'assetto lipidico. Dal punto di vista patogenetico, i meccanismi sottostanti attraverso i quali la NAFLD potrebbe portare allo sviluppo od alla progressione di retino e nefropatia sono ancora poco conosciuti. La teoria più plausibile è l'importante presenza di fattori di rischio per microangiopatia sia nei soggetti con NAFLD sia nei soggetti con nefro e/o retinopatia. Comunque si può notare che la NAFLD è associata con problematiche microangiopatiche indipendentemente da un ampio spettro di fattori di rischio noti: da ciò si deduce che essa agisce anche con meccanismi patogenetici importanti come ad esempio l'aumento di IL-6, TNF- α , proteina C-reattiva, di TGF- β e di prodotti di glicazione avanzata (72).

Relazione patogenetica tra NAFLD e vasculopatia

Dal punto di vista patogenetico, i possibili meccanismi biologici che legano NAFLD e aterosclerosi sono sconosciuti.

La NAFLD nelle sue forme più avanzate potrebbe rappresentare uno stimolo per un ulteriore aumento di insulino-resistenza e dislipidemia (con una caratteristico aumento

di produzione di trigliceridi e remnants delle LDL) portando ad un aumento dei processi aterosclerotici. Tale ipotesi è supportata dalla relazione lineare tra contenuto grasso a livello epatico e dirette misure di insulino-sensibilità epatica ed è convalidata da studi prospettici che dimostrano che l'aumento di enzimi epatici è un fattore predittivo di diabete di tipo 2 indipendente dall'obesità.

Un altro possibile meccanismo patogenetico che lega NAFLD ed aterosclerosi può essere rappresentato da un aumento dello stress ossidativo e dalla cronica subclinica infiammazione che è stata reputata come fattore importante di progressione da steatosi a forme più avanzate (50). Le specie reattive dell'ossigeno derivate dall'ossidazione epatica di acidi grassi possono perpetuare il danno a livello epatico ed aggiungono ulteriori stimoli aterogenici alla situazione pro-infiammatoria che è strettamente legata alla sindrome metabolica specialmente attraverso l'aumento di proteina C. È stato riportato che i pazienti con NAFLD hanno livelli aumentati di markers di stress ossidativo e di flogosi: tali markers sono anche associati alla severità istologica della steatosi epatica.

Un calo della adiponectina (una citochina secreta dal tessuto adiposo e con proprietà anti-aterogeniche) potrebbe rappresentare un altro possibile meccanismo che lega NAFLD ed aterosclerosi. Inoltre l'adiponectina ha un ruolo di protezione del fegato che include l'ossidazione di acidi grassi, l'inibizione della sintesi di acidi grassi e la soppressione di TNF- α .

Pazienti con NAFLD hanno una riduzione dell'adiponectina che si associa con la severità istologica della NAFLD indipendentemente dall'obesità viscerale e da altri componenti della sindrome metabolica. Questa osservazione potrebbe essere rilevante dal momento che il deficit di adiponectina è legato sia alla sindrome

metabolica sia a malattie cardiovascolari e potrebbe essere legata anche alla progressione della NAFLD (89).

Infine, un'altra teoria sostiene che il legame tra NAFLD e un aumento della aterogenesi sia dovuto alla presenza di alterazioni del metabolismo delle lipoproteine specialmente nella fase post-prandiale (90).

Una recente review di Loria et al ha analizzato in dettaglio le basi fisiopatologiche e le evidenze cliniche che correlano la NAFLD con le malattie cardiovascolari; viene ipotizzata l'esistenza di un "asse fegato-vasi" su cui agiscono gli stessi fattori patogenetici (in particolare iperdislipidemia e infiammazione) che inducono una simile evoluzione istologica (91).

Schwimmer et al.(92) hanno ipotizzato inoltre come la steatosi epatica sia un fattore di rischio precoce di aterosclerosi e che essa comincia già nei bambini progredendo poi nell'età adulta. Sono state valutate 817 autopsie di bambini (tra i 2 ed i 19 anni) deceduti per cause accidentali. La steatosi epatica (definita come la presenza di epatociti steatosici maggiore del 5%) era presente nel 15% di questo gruppo, una lieve aterosclerosi delle coronarie nel 21% ed una severa aterosclerosi nel 2%. Inoltre la presenza di aterosclerosi era circa il doppio nei soggetti con NAFLD rispetto ai soggetti senza steatosi. Da ciò si è concluso che la steatosi epatica potrebbe essere non solo un marker, ma anche un mediatore precoce di aterosclerosi.

NAFLD E SINDROME METABOLICA

Lo stile di vita sedentario e una dieta ipercalorica hanno contribuito ad aumentare "l'epidemia" dell'obesità nei paesi occidentali. Numerosi studi epidemiologici

suggeriscono un aumento del rischio cardiovascolare e del diabete di tipo 2 in pazienti obesi e sovrappeso. Inoltre l'incidenza della sindrome metabolica e della NAFLD che possono anch'esse precedere l'insorgenza del diabete di tipo 2 e le patologie cardiovascolari sono in aumento.

La sindrome metabolica (un insieme di anomalie metaboliche in cui l'obesità addominale e l'insulino-resistenza sono le componenti principali) colpisce circa il 25% della popolazione americana adulta ed è associata ad un aumento del rischio cardiovascolare.

La relazione tra NAFLD e sindrome metabolica è molto complessa. Circa il 90% dei pazienti con NAFLD ha almeno una componente della sindrome metabolica e circa il 33% ha i requisiti per la diagnosi di sindrome metabolica, questo indica che la NAFLD possa essere la rappresentazione epatica di tale sindrome. La presenza della sindrome metabolica predice un aumentato rischio di avere NAFLD sia nel maschio sia nella femmina (93).

Diagnosi di sindrome metabolica

La sindrome metabolica consiste in un insieme di anomalie metaboliche che includono obesità viscerale, insulino-resistenza, intolleranza ai carboidrati o diabete, dislipidemia, ipertensione.

Negli anni '70 la scuola medica patavina rilevò e descrisse un'associazione non casuale di alterazioni metaboliche (frequente coesistenza di obesità, diabete mellito di tipo 2, dislipidemia ed iperuricemia) (94). Successivamente Reaven nel 1988 definì Sindrome X o sindrome dell'insulino-resistenza l'associazione di alterazioni metaboliche che come fattore patogenetico comune avevano uno stato di insulino-resistenza con conseguente iperinsulinemia compensatoria (95). Ferrannini e Haffner

poi ne perfezionarono la definizione sottolineando la frequente combinazione di almeno tre alterazioni metaboliche tra obesità, diabete, ipertensione, ipertrigliceridemia (96).

Molti esperti di questo settore hanno cercato di unificare la definizione di sindrome metabolica. Attualmente si accettano diverse definizioni, le più usate sono quella proposta dalla Organizzazione Mondiale della Salute (WHO), quella proposta dal Gruppo Europeo per lo Studio dell'Insulino-Resistenza (EGIR) e quella del Third Adult Treatment Panel (ATP III). IDF (International Diabetes Federation) nel 2006 (97) ha proposto un'ultima definizione di sindrome metabolica nella quale il requisito fondamentale è rappresentato dall'obesità centrale (deve essere sempre presente) associata ad almeno due fattori tra ipertensione, alterata glicemia a digiuno (>100mg/dl) o diabete, bassi valori di HDL, aumento dei trigliceridi. La definizione propone di considerare alcune criteri metabolici addizionali (hs-PCR, TNF α , IL-6, ridotta adiponectina, disfunzione endoteliale e microalbuminuria, fibrinogeno, assetto lipidico proaterogeno, ApoB e LDL piccole e dense, distribuzione del grasso). Lo scopo della definizione di sindrome metabolica è quello di individuare quei soggetti che hanno un aumentato rischio cardiovascolare.

Il problema principale nell'avere più di una definizione di sindrome metabolica è la difficoltà di confrontare studi diversi, così come è difficile ottenere una stima precisa della prevalenza di questa sindrome (98).

Legame tra NAFLD e sindrome metabolica

L'iperinsulinemia e l'insulino-resistenza giocano un ruolo importante nella patogenesi della NAFLD, rappresentano il cardine della sindrome metabolica e sono strettamente associate all'obesità viscerale.

Diversi dati suggeriscono che obesità, sindrome metabolica e NAFLD sono strettamente associate tra di loro al punto che la NAFLD viene considerata da molti autori come la manifestazione epatica dell'insulino-resistenza e della sindrome metabolica.

La sindrome metabolica (in parte attraverso l'insulino-resistenza e l'alterata glicemia a digiuno) è fortemente associata con la steatosi, la fibrosi e la cirrosi in molti adulti obesi. Inoltre, numerosi studi hanno dimostrato che obesità, diabete tipo 2, dislipidemia, ipertensione, insulino-resistenza sono fortemente associati con la NAFLD. Nei soggetti con NAFLD si evidenzia rispetto ai controlli una riduzione dell'insulino-sensibilità sia a livello epatico sia a livello periferico (tessuto muscolare). A conferma dell'associazione tra insulino-resistenza e steatosi epatica è stato dimostrato che nei soggetti con NAFLD vi sono delle alterazioni metaboliche, quali una ridotta inibizione della gluconeogenesi ed una ridotta beta-ossidazione degli acidi grassi, tipiche dell'insulino-resistenza.

Comunque, la questione se l'insulino-resistenza a livello epatico sia causa o conseguenza della steatosi epatica è ancora irrisolta (99).

Inoltre, la sindrome metabolica predice un alto rischio di maturare la NAFLD sia nel maschio sia nella femmina, indipendentemente dall'aumento di peso, e soggetti affetti da sindrome metabolica hanno più probabilità di avere una qualche progressione all'interno della NAFLD (93).

Un'altra importante osservazione è che i pazienti con NAFLD mostrano uno stress ossidativo ed una disfunzione endoteliale molto più severi rispetto a soggetti insulino-resistenti non steatosici (se paragonati per HOMA e grasso viscerale).

I livelli di molecole di adesione endoteliale sono più alti nella NAFLD che nell'insulino-resistenza senza epatopatia e la steatosi epatica predice l'aumento della E-selectina e

dell'ICAM-1 indipendentemente da altri fattori. La concentrazione plasmatica di queste molecole è legata ad un aumento del rischio cardiovascolare in soggetti apparentemente sani in studi molto ampi.

Infine, Devers et al. hanno proposto di inserire all'interno dei parametri della sindrome metabolica anche l'alterazione delle transaminasi e delle γ GT. Questi Autori dimostrano che le transaminasi epatiche sono strettamente associate alle componenti diagnostiche usate per la definizione di sindrome metabolica del ATP III e che i valori ottimali siano 27 U/l per i maschi e 20 per le femmine (100).

Il ruolo clinico delle γ GT sembra essere quello di aumentare il valore predittivo positivo della definizione proposta dalla ATP III nel predire malattie cardiovascolari e di essere un indice relativamente sensibile e di deposito di grasso a livello epatico e di altri organi (come le arterie ed il pancreas). Inoltre, alcuni studi hanno dimostrato la relazione tra aumento delle γ GT con gli eventi cardiovascolari (101). I limiti di usare questo nuovo parametro sono da cercarsi nelle cause di aumento delle γ GT, in particolare l'epatopatia alcolica e altre cause di epatopatia.

Rapporto tra NAFLD e obesità viscerale

Nel 2002 Scheen e Luyckx (102) hanno affermato che persone obese hanno un fegato grasso e che l'obesità è la condizione più frequentemente associata con la NAFLD. In molti studi infatti i pazienti con NAFLD sono anche obesi (tale percentuale varia dal 69 al 100% in base allo studio considerato). Inoltre è stato dimostrato che l'obesità aumenta il rischio di progressione della epatopatia indotta dall'alcol o dall'epatite C.

Un problema importante resta quello di capire quale sia il miglior indicatore di obesità viscerale e di obesità centrale. Infatti, il BMI è visto come un fattore indipendente di

steatosi epatica, ma la circonferenza addominale ed il rapporto vita-fianchi sembrano essere indici migliori di obesità centrale. L'obesità addominale (misurata con dati antropometrici) sembra debolmente ma costantemente associata con l'aumento di enzimi epatici (soprattutto ALT e γ GT) e quindi con il danno epatico. Invece, il rapporto vita-fianchi sembra dare informazioni sulla distribuzione regionale di tessuto adiposo che è indipendente dal grado di obesità e meno fortemente collegata con la quantità di tessuto adiposo a livello dei visceri addominali.

Dal punto di vista patogenetico, è stato visto che gli acidi grassi liberi e le adipochine (come la leptina, adiponectina ed il TNF- α) rilasciati dagli adipociti nel tessuto viscerale adiposo sono coinvolti nella progressione della sindrome metabolica e della NAFLD. Infatti, il grasso viscerale induce insulino-resistenza epatica grazie al transito attraverso la vena porta di acidi grassi liberi e glicerolo rilasciati dal tessuto adiposo stesso. Inoltre, come già ricordato, il tessuto adiposo è un organo endocrino che libera citochine pro-infiammatorie e pro-fibrotiche come la leptina ed il TNF- α .

Il legame tra il grasso viscerale e la steatosi epatica può essere spiegato grazie all'insulino-resistenza: la resistenza all'azione anti-lipolitica dell'insulina induce la rapida mobilizzazione di acidi grassi liberi dal grasso viscerale piuttosto che dal grasso sottocutaneo ed indirizza questi prodotti verso il fegato. Ciò suggerisce che l'accumulo di grasso viscerale potrebbe essere un fenomeno primario giocando un ruolo cruciale nella NAFLD.

La riduzione di peso rappresenta una valida terapia della NAFLD sia per quanto riguarda la steatosi epatica che per l'infiammazione e la fibrosi.

In questo ambito il BMI e lo spessore del grasso viscerale sono i fattori legati più fortemente con il grado di steatosi epatica. In un modello di regressione lineare dove il grado di steatosi epatica è la variabile dipendente e le altre variabili (come il BMI, le

transaminasi, lo spessore del grasso viscerale ecc.) sono quelle indipendenti si vede che le ALT, lo spessore del grasso viscerale e l'albumina sierica sono fattori indipendenti che predicono il grado di steatosi (103).

Stranges et al. (104) hanno dimostrato che lo spessore del grasso addominale è correlato con i livelli di ALT e γ GT più del BMI. Inoltre, in un modello multivariato, lo spessore addominale, seguito dal BMI, è il più importante fattore che predice l'innalzamento delle ALT in entrambi i sessi e delle γ GT solo nelle donne indipendentemente dalla menopausa. Questi reperti supportano il ruolo centrale dell'obesità viscerale, indipendentemente dall'obesità totale, nell'innalzamento degli enzimi epatici e quindi del danno epatico.

Nonostante la pleora di dati fin qui pubblicati, rimane da dimostrare il ruolo della steatosi epatica nel soggetto affetto da diabete di tipo 2 nel determinare associazioni con altri fattori della sindrome metabolica e con lo spessore medio-intimale.

OBBIETTIVI DELLO STUDIO

Gli obiettivi dello studio sono stati quelli di valutare la prevalenza e l'entità della steatosi epatica in un campione di pazienti affetti da diabete mellito tipo 2 e sindrome metabolica afferenti al nostro servizio di Diabetologia e di valutare l'associazione tra i vari fattori metabolici e il grado di steatosi epatica. Sono stati valutati inoltre la presenza di vasculopatia carotidea (espressa come ispessimento medio-intimale, placche carotidiche, entità della stenosi carotidea) e di alterazioni della funzione endoteliale (misurata come Flow mediated dilatation o FMD), e l'associazione esistente tra steatosi epatica e vasculopatia subclinica in questa tipologia di pazienti.

PROTOCOLLO SPERIMENTALE

SOGGETTI STUDIATI

Sono stati arruolati 60 pazienti (25 maschi e 35 femmine, tutti di razza caucasica, con età media di 65 ± 7 anni) afferenti al Servizio di Diabetologia che presentavano diabete mellito tipo 2 e parametri della sindrome metabolica (classificata secondo i criteri ATP III). I criteri di esclusione erano: introito alcolico superiore a 20 g/die, epatite virale cronica, malattie epatiche autoimmunitarie, utilizzo di farmaci epatotossici.

DISEGNO SPERIMENTALE

I soggetti sono stati valutati presso gli ambulatori di Malattie del Metabolismo dell'Azienda Ospedaliera-Università di Padova. Al mattino, in condizioni di digiuno notturno, sono state registrate: le misure antropometriche (peso, altezza, circonferenza addominale alla vita e ai fianchi), la pressione arteriosa, la frequenza cardiaca e le notizie anamnestiche di rilievo (familiarità per diabete, malattie cardiovascolari, obesità, malattie autoimmuni; introito alcolico; abitudine al fumo; attività fisica settimanale; patologie pregresse; assunzione di farmaci; complicanze micro e macrovascolari della malattia diabetica). E' stato eseguito il prelievo ematico basale (50 cc) per il dosaggio dei parametri del metabolismo glucidico (glicemia, insulinemia, C-peptide, emoglobina glicata) e lipidico (colesterolo totale, colesterolo-HDL, trigliceridi), della funzionalità epatica (transaminasi, γ GT, fosfatasi alcalina, bilirubina, ceruloplasmina, albumina, ferritina, transferrina, emocromo, immunoglobuline G), delle citochine infiammatorie (PCR ad alta sensibilità, ICAM, VCAM, IL-6, TNF α , trombomodulina), di adipochine (leptina), di fattori trombogenici (fibrinogeno), dei marcatori di autoimmunità (autoanticorpi anti-nucleo, anti-mitocondri, antimuscolo liscio, anti-microsomi renali ed epatici, anti-parete gastrica), dei marcatori virali di epatite A, B, C. E' stato raccolto un campione estemporaneo di urina per il dosaggio del rapporto microalbuminuria/creatininuria. Dopo un adeguato periodo di riposo, di almeno 15 minuti, è stata determinata la vasodilatazione flusso mediata (FMD). Successivamente sono state studiate le carotidi con metodica eco-color-doppler. Infine il paziente ha eseguito, presso gli ambulatori della Clinica Medica V, l'ecografia epatica con quantificazione del grado di steatosi.

Ecografia epatica

L'ultrasonografia è il test di screening più usato per diagnosticare la steatosi epatica (NAFLD). E' una tecnica diagnostica non invasiva e poco costosa, ma la sensibilità dell'esame è limitata dall'incapacità di rilevare l'infiltrazione di grasso quando questa è inferiore al 33% circa (2); anche la specificità è limitata, in quanto è difficile distinguere tra steatosi e fibrosi. L'ecografia inoltre non permette di valutare la presenza di fenomeni necro-infiammatori e quindi non permette di rilevare la presenza di NASH (105). L'utilizzo di tale diagnostica non è indicato per il follow-up in pazienti con NAFLD (106).

Vasodilatazione flusso mediata (Flow Mediated Dilation, FMD)

La funzione endoteliale intatta garantisce le normali azioni vasodilatatrice, anti-infiammatoria e anti-aterotrombotica dell'endotelio. La disfunzione endoteliale, sia a livello coronarico che periferico, precede lo sviluppo della placca aterosclerotica. L'FMD rappresenta una metodica non invasiva di valutazione della funzione endoteliale e fornisce pertanto un indice precoce di disfunzione/danno vascolare. Lo stimolo ischemico che viene indotto nell'esecuzione del test stimola l'endotelio a rilasciare monossido d'azoto (NO) e provoca conseguente vasodilatazione; la vasodilatazione può essere visualizzata mediante ecocolordoppler, e quantificata come un indice di funzione endoteliale.

Ecocolordoppler dei tronchi sovraortici

Tale diagnostica non invasiva trova largo impiego per la valutazione dello stato della parete arteriosa (presenza di ispessimento medio-intimale e di calcificazioni), per la ricerca di placche e di variazioni del flusso emodinamicamente significative. L'ecografia permette di descrivere la localizzazione della placca sulla parete arteriosa (eccentrica, concentrica), il segmento della carotide interessato dalla placca, la caratterizzazione strutturale della placca (ecogenicità della placca, presenza di calcificazioni, omogeneità della struttura), la superficie della placca (regolare, irregolare). Il doppler permette di studiare la morfologia dell'onda (che facilita nella differenziazione della carotide interna ed esterna) e la velocità del flusso identificando accelerazioni patologiche. L'esecuzione dell'ecocolordoppler carotideo è indicato nei soggetti che presentino: recente ictus cerebri o TIA, soffio laterocervicale, cardiopatia ischemica, arteriopatia arti inferiori/aneurisma aorta addominale, età superiore ai 65 anni con fattori di rischio cardiovascolari (diabete, ipertensione arteriosa, ipercolesterolemia, fumo). L'esecuzione dell'ecodoppler TSA è consigliabile ai soggetti con più di 65 anni e con fattori di rischio multipli, a scopo di prevenzione dell'ictus (Linee Guida SPREAD del 2007), mentre il ruolo della misurazione dell'IMT nella pratica clinica deve ancora essere dimostrato.

Spessore medio-intimale carotideo (IMT)

Lo spessore intimo-mediale (IMT) dei grandi vasi arteriosi, in particolare delle arterie carotidi, può essere misurato con ultrasonografia con metodica relativamente semplice. Esso rappresenta una misura sicura, poco costosa, precisa e riproducibile

che giustifica il sempre maggior utilizzo di questo parametro nella ricerca clinica, con lo scopo di verificare il valore di nuovi emergenti fattori di rischio in studi osservazionali o epidemiologici, in soggetti selezionati o nella popolazione generale. La determinazione dell'IMT permette di misurare la progressione delle alterazioni precoci della parete vascolare. L'IMT aumenta con il progredire dell'età, ma dati epidemiologici attualmente disponibili indicano che un valore di IMT pari o superiore a 1 mm, per qualsiasi età, si associa ad un rischio significativamente maggiore di infarto miocardico e/o di malattia cerebrovascolare. Nella pratica clinica la misurazione dell'IMT non è un esame attualmente routinario, ma il valore predittivo dell'IMT nei confronti della complicità cardiovascolare suggerisce che questo parametro potrebbe partecipare in futuro alla stratificazione del rischio cardiovascolare in soggetti asintomatici, in prevenzione primaria. Un aumento dell'IMT è risultato associato a patologie aterosclerotiche a livello coronarico e ai più comuni fattori di rischio per l'aterosclerosi e sembra assumere rilevanza clinica soprattutto in associazione allo studio di altri parametri tra cui la dilatazione flusso mediata dell'arteria omerale (FMD) (107). L'IMT in tutti gli studi sembra essere correlato con età, ipertensione, bassi valori di HDL, aumento della massa corporea e durata del diabete (108) anche se alcuni studi non evidenziano correlazioni fra obesità addominale ed aumento dell'IMT (109) .

PROCEDURE ANALITICHE

Dosaggi bioumorali

La glicemia è stata determinata mediante il metodo riflettometrico. L'insulina è stata dosata con metodo EIA, leptina e glucagone sono stati determinati mediante metodica RIA, il C-peptide plasmatico è stato determinato mediante immunodosaggio chemiluminescente. La colesterolemia totale, il colesterolo HDL, i trigliceridi, le γ GT, l'urea, l'acido urico, sono stati misurati con metodo enzimatico colorimetrico. Il colesterolo LDL è stato calcolato applicando la formula di Friedewald. Emoglobina, creatinina, bilirubina, albumina, sideremia e ALP sono state dosate con metodo colorimetrico. AST e ALT sono state determinate con metodo enzimatico. I leucociti sono stati dosati con citometria a flusso con laser a semiconduttori; la determinazione dei globuli rossi è stata eseguita tramite rilevazione resistiva con focalizzazione idrodinamica; le piastrine sono state dosate con citometria a flusso. Gli autoanticorpi sono stati dosati con metodica immunofluorescenza indiretta. L'emoglobina glicata è stata dosata con HPLC. PT, PTT e fibrinogeno sono stati dosati con metodo coagulometrico, il fattore di v-Willebrand con metodo immunologico con lettura nefelometrica.

La PCR ad alta sensibilità è stata determinata mediante nefelometria, la VES con metodo fotometrico, la ferritina con metodo a immunochemiluminescenza, TNF- α , IL-6 e trombomodulina sono stati dosati con metodo immunoenzimatico in fase solida.

Quantificazione ecografica della steatosi epatica

La steatosi epatica è stata determinata ecograficamente (ecografo Philips ATL 5000) in modo semiquantitativo (con una scala che va da 0 a 3) sulla base dell'ecogenicità epatica (confrontata con quella della corticale renale), dell'attenuazione del fascio ultrasonoro e della perdita di risoluzione dei dettagli strutturali intraepatici (vasi). Per valutare la steatosi epatica quantitativamente e per una migliore sensibilità e specificità (in caso di steatosi superiore a 5% del fegato) è stata inoltre acquisita un'immagine digitale del rene e del fegato e successivamente analizzata con un software dedicato (HDI-Lab), che confrontando le intensità dei grigi di aree selezionate dei 2 parenchimi ha calcolato il rapporto fegato/rene. Da tale rapporto è stata ricavata una scala oggettiva per quantificare la steatosi che va da 0 a 5 (Tabella 3).

GRADO DI STEATOSI OGGETTIVA	0	1	2	3	4	5
RAPPORTO FEGATO/RENE	< 1.33	1.33-1.8	1.81-2.3	2.31-2.8	2.81-3.3	>3.31

Tabella 3: Rapporto fegato/rene

Valutazione della vasodilatazione flusso mediata (Flow Mediated Dilation - FMD)

Per l'esecuzione del test il soggetto deve essere a digiuno, non aver fumato di recente, sdraiato supino su un lettino, con il braccio in posizione confortevole e in posizione adeguata alla visualizzazione dell'arteria brachiale. L'arteria brachiale viene visualizzata al di sopra della fossa antecubitale, su un piano longitudinale. Viene identificato un segmento in cui siano chiaramente visibili le interfacce intimali anteriore e posteriore per l'acquisizione delle immagini in 2D, che permetta la misurazione del diametro in condizioni basali. Viene quindi stimato il flusso con Doppler pulsato, campionando al centro dell'arteria. Al fine di indurre uno stimolo alla vasodilatazione nella stessa arteria brachiale, viene posizionato il bracciale dello sfigmomanometro a livello dell'avambraccio; il bracciale viene gonfiato ad una pressione di 50 mmHg al di sopra della pressione sistolica (Figura 6). Ciò causa ischemia e dilatazione dei vasi di resistenza a valle, attraverso meccanismi di autoregolazione vascolare. L'ischemia viene mantenuta per cinque minuti. Il successivo sgonfiaggio del bracciale determina un breve periodo di iperafflusso (iperemia reattiva) per equilibrare la dilatazione dei vasi di resistenza. L'incremento dello shear-stress che ne consegue causa dilatazione dell'arteria brachiale. L'immagine longitudinale dell'arteria viene registrata continuamente da trenta secondi prima fino a due minuti dopo lo sgonfiaggio (Figura 7). Il segnale Doppler pulsato che misura la velocità di flusso durante iperemia viene ottenuto immediatamente dopo lo sgonfiaggio, entro quindici secondi. L'entità della vasodilatazione viene espressa come l'incremento in percentuale del diametro massimo ottenuto dopo il rilascio dall'ischemia rispetto al diametro basale.

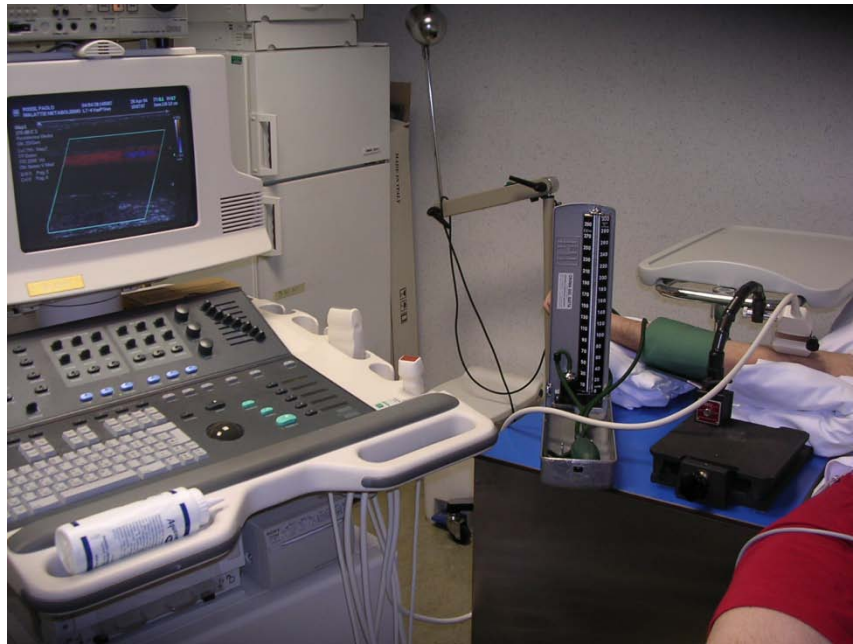


Figura 6: Tecnica di misurazione dell' FMD
(strumenti utilizzati e posizione del paziente)

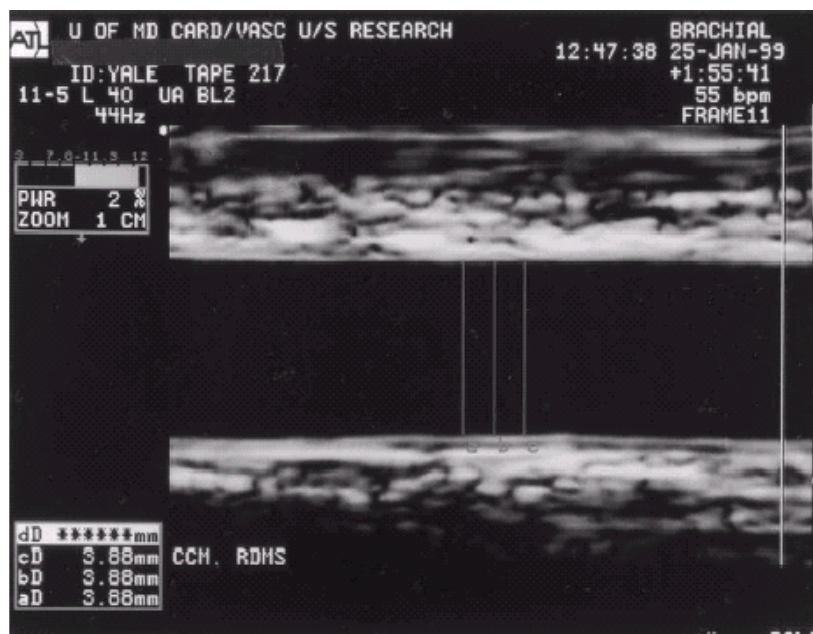


Figura 7: Valutazione dell'FMD (misurazione del diametro arterioso pre e post-ischemia)

Ecocolordoppler dei tronchi sovraortici

L'esame viene eseguito sul paziente sdraiato supino, con collo esteso ruotato a destra e poi a sinistra. Abbiamo utilizzato ecografo Philips ATL 5000, con sonda ecodoppler 7,5 MHz lineare B-mode. Viene inizialmente analizzata la carotide comune dall'origine alla biforcazione, prima in sezione trasversale e successivamente longitudinale. In modalità "eco" vengono rilevate eventuali placche e viene misurato lo spessore medio-intimale; in modalità "color" si valuta il riempimento del vaso ed eventuali turbolenze di flusso; in modalità "color-doppler", effettuando la correzione dell'angolo di incidenza del Doppler pulsato, mantenendolo fra 40° e 60° (meglio a 60° per un riferimento costante), si valuta la morfologia dell'onda sfigmica e si misura il picco sistolico. Successivamente si studiano le carotidi interna ed esterna, differenziandole in base al flusso, alla posizione, al diametro e alla presenza di rami collaterali; entrambe vengono analizzate con modalità eco-color-doppler. Il grado di stenosi, determinato dall'eventuale placca, viene calcolato utilizzando il metodo ECST (110) che valuta il rapporto tra il diametro della placca e il diametro del vaso a livello della placca. La quantificazione della stenosi è determinata inoltre dall'accelerazione del flusso calcolando il picco sistolico, il flusso diastolico, il rapporto tra picco sistolico in carotide comune e carotide interna. Vengono rilevate inoltre eventuali anomalie di decorso (Kinking e coiling). La placca è definita come una lesione focale che invade il lume dell'arteria per almeno 0.5mm o per un valore pari al 50% del valore dell'IMT circostante oppure come un ispessimento di almeno 1.5mm (misurato dall'interfaccia media-avventizia fino all'interfaccia intima-lume) (111).

Misurazione dello spessore medio-intimale carotideo (IMT)

Nel presente studio abbiamo utilizzato una sonda ecodoppler 7,5 MHz lineare B-mode, Philips ATL 5000. La misurazione viene effettuata, a livello della carotide comune ad 1 cm dalla biforcazione, a livello della biforcazione e della carotide interna, valutando la parete distale. Per ciascun segmento l'immagine ultrasonografica viene fissata in più di una direzione; vengono effettuate multiple misurazioni e si considera l'IMT maggiore e la media degli IMT esaminati a livello dei diversi segmenti (Figura 8).

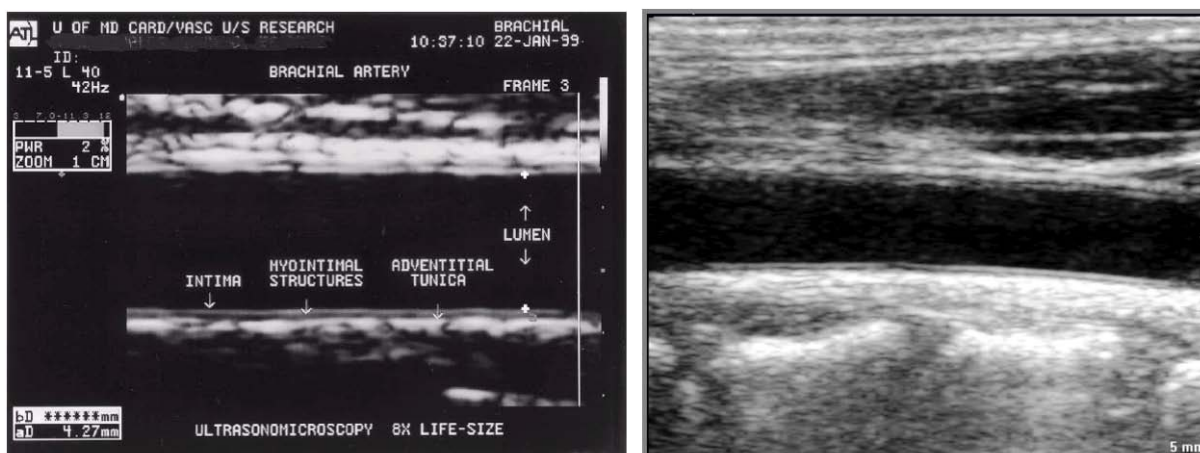


Figura 8: IMT (immagine dell'arteria in longitudinale utilizzata per misurare lo spessore medio-intimale)

Analisi statistica

Le analisi statistiche sono state eseguite utilizzando il programma R (a GNU project). I risultati sono espressi come media \pm deviazione standard. Il campione è stato diviso inizialmente per i 4 gradi della steatosi soggettiva (da 0 a 3); per valutare l'uguaglianza simultanea dei 4 gruppi è stato usato il test di Kruskal Wallis; è stato scelto tale test perché l'ipotesi di normalità dei dati non era soddisfatta (test di normalità eseguito con il metodo Shapiro Wilk). I pazienti sono stati successivamente divisi in 2 gruppi (in base al valore di IMT, con cut off pari a 0.8 mm), per valutare l'uguaglianza tra i 2 gruppi sono stati eseguiti i test t di Student per dati non appaiati per le variabili continue ed il test χ^2 per le variabili di categoria. I dati sono stati analizzati tramite un modello di regressione multipla per valutare l'associazione tra variabili e il modello di regressione per dati ordinati Ordered Probit che esprime, in base alle variabili indipendenti, la probabilità di appartenere ad una classe di steatosi. Un valore di p inferiore a 0.05 è stato considerato statisticamente significativo.

RISULTATI

Per la diagnosi di sindrome metabolica sono stati applicati i criteri del NCEP-ATP III.

E' stata diagnosticata in base alla presenza di almeno tre dei seguenti criteri:

- circonferenza addominale maggiore di 102 cm nei maschi, maggiore di 88 cm nelle femmine;
- pressione arteriosa maggiore di 130/85 mmHg;
- trigliceridi maggiori di 150 mg/dl;
- HDL colesterolo minore di 40 mg/dl nei maschi, minore di 50 mg/dl nelle femmine;
- glicemia a digiuno maggiore di 110mg/dl o pregressa diagnosi di diabete.

I 60 soggetti studiati (35 di sesso femminile e 25 maschile) erano tutti affetti da diabete mellito tipo 2. Tra gli altri fattori della sindrome metabolica i più rappresentati erano l'ipertensione arteriosa (95%) e l'obesità viscerale (87%), a seguire l'ipertrigliceridemia (33%) e la riduzione del colesterolo HDL (27%). Solo 2 fattori della sindrome erano presenti in 7 soggetti, 3 fattori in 28 soggetti, 4 fattori in 17 soggetti, tutti e 5 i fattori in 8 soggetti.

La terapia del diabete era solo dietetica nel 20% dei pazienti; con antidiabetici orali nel 63% e con antidiabetici orali associati ad insulina basale nel 17%; la metformina era assunta dal 55% dei pazienti. Non vi era differenza statisticamente significativa tra C-peptide, insulinemia, HOMA, glicemia basale dei pazienti in terapia insulinica rispetto al restante gruppo.

Le caratteristiche cliniche e biumorali dei pazienti studiati sono riportate in tabella 4 e 5 e in figura 9.

NUMEROSITA' CAMPIONE		60
SESSO (M/F)		25/35
ETA' (anni)		65 ± 7
DIABETE MELLITO		100 %
DURATA DIABETE (anni)		10.3 ± 8.9
IPERTENSIONE ARTERIOSA		95 %
in terapia		88 %
DISLIPIDEMIA		82 %
in terapia		48 %
IPERTRIGLICERIDEMIA		33 %
HDL-COLESTEROLEMIA RIDOTTA		27 %
Iper TG + Ipo HDL		17 %
OBESITA' CENTRALE		87 %
GRADI DI OBESITA'	BMI < 25	8 %
	BMI 25-30	28 %
	BMI 30-35	32 %
	BMI > 35	32 %

Tabella 4: Caratteristiche pazienti studiati

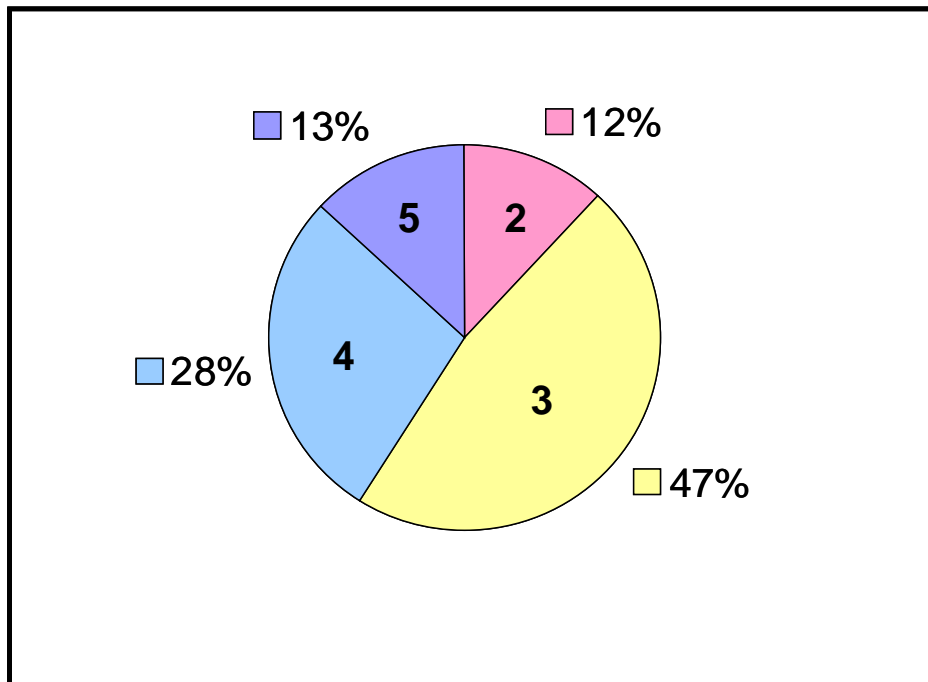


Figura 9 Prevalenza dei fattori della sindrome metabolica

ATTIVITA' FISICA	Mai / Occasionale	Meno 30	Più 30 minuti/die
	57%	20%	23%
FUMO	NO	EX	SI'
	57%	33%	10%
ASSUNZIONE DI ALCOOL	NO	< 10 gr/die	10-20 gr/die
	42%	35%	23%

Tabella 5: Stile di vita dei pazienti studiati

Nessuno dei pazienti riferiva sintomatologia specifica per epatopatia e nemmeno sintomatologia aspecifica. Tra gli esami bioumorali segnaliamo un aumento delle ALT in 12 pazienti (20%), delle AST in 8 pazienti (13%) e delle γ GT in 14 pazienti (23%), il rapporto AST/ALT è risultato < 1 nel 55% dei pazienti. Il rialzo delle transaminasi era

comunque < 3 volte il range di normalità. I parametri biometrici e bioumorali sono riportati in tabella 6.

I markers di epatite virale (HBV e HCV) erano negativi in tutti i soggetti. Tra gli autoanticorpi dosati non vi era positività per autoanticorpi anti-mitocondrio e anti-LKM; mentre vi era positività a basso titolo per autoanticorpi anti-nucleo (51%), anti-muscolo liscio (32%) e anti-parete gastrica (8%). Tali risultati escludono quindi epatite su base autoimmune.

Il 63% dei pazienti presentava placche carotidee con stenosi variabile tra 15 e 45%, un paziente presentava stenosi del 60% (già sottoposto ad endoarteriectomia carotidea controlaterale). 5 pazienti avevano un'anamnesi positiva per cardiovasculopatia, 3 presentavano vasculopatia coronarica (2 con pregresso infarto miocardico e 1 con intervento di rivascolarizzazione) e 2 vasculopatia carotidea (1 episodio di TIA e 1n paziente con pregressa endoarteriectomia). Le complicanze micro e macroangiopatiche analizzate sono riportate in tabella 7.

BMI (Kg/m²)	32.5 ± 5.7
Waist (cm)	106.8 ± 11.6
Waist/hip	0.97 ± 0.07
PAS (mmHg)	146 ± 16
PAD (mmHg)	88 ± 9
Colesterolo totale (mg/dl)	188 ± 25
HDL-colesterolo (mg/dl)	55 ± 15
LDL-colesterolo (mg/dl)	106 ± 21
Trigliceridi (mg/dl)	139 ± 65
AST/ALT < 1 (%)	55
Insulinemia (mU/l)	13.3 ± 8.6

Glicemia (mg/dl)	166 ± 39
HOMA	5.6 ± 4.9
HbA1c (%)	7.7 ± 1.2
Leptina (ug/l)	22.5 ± 16.6

Tabella 6: Parametri biometrici e biumorali

Normoalbuminuria (< 30 mg/gr) %	78
Microalbuminuria (30-300 mg/gr) %	19
Microalbuminuria (> 300 mg/gr) %	3
Presenza di retinopatia diabetica %	19
IMT medio (mm)	0.88 ± 0.23
IMT max (mm)	1.20 ± 0.29
Presenza di placche (%)	63
FMD (%)	4.8 ± 1.7

Tabella 7: Prevalenza di microangiopatia e macroangiopatia

GRADO DI STEATOSI NEI PAZIENTI DIABETICI

Nell'88% dei soggetti studiati si evidenziava steatosi epatica all'ecografia. L'entità della steatosi è stata quantificata in 4 gradi come steatosi soggettiva (grado 0-3) e in 6 gradi come steatosi oggettiva (grado 0-5); quest'ultima stadiazione quantitativa viene dedotta dal valore del rapporto fegato/rene calcolato confrontando l'intensità dei grigi dei due parenchimi (Tabella 3; Figura 10).

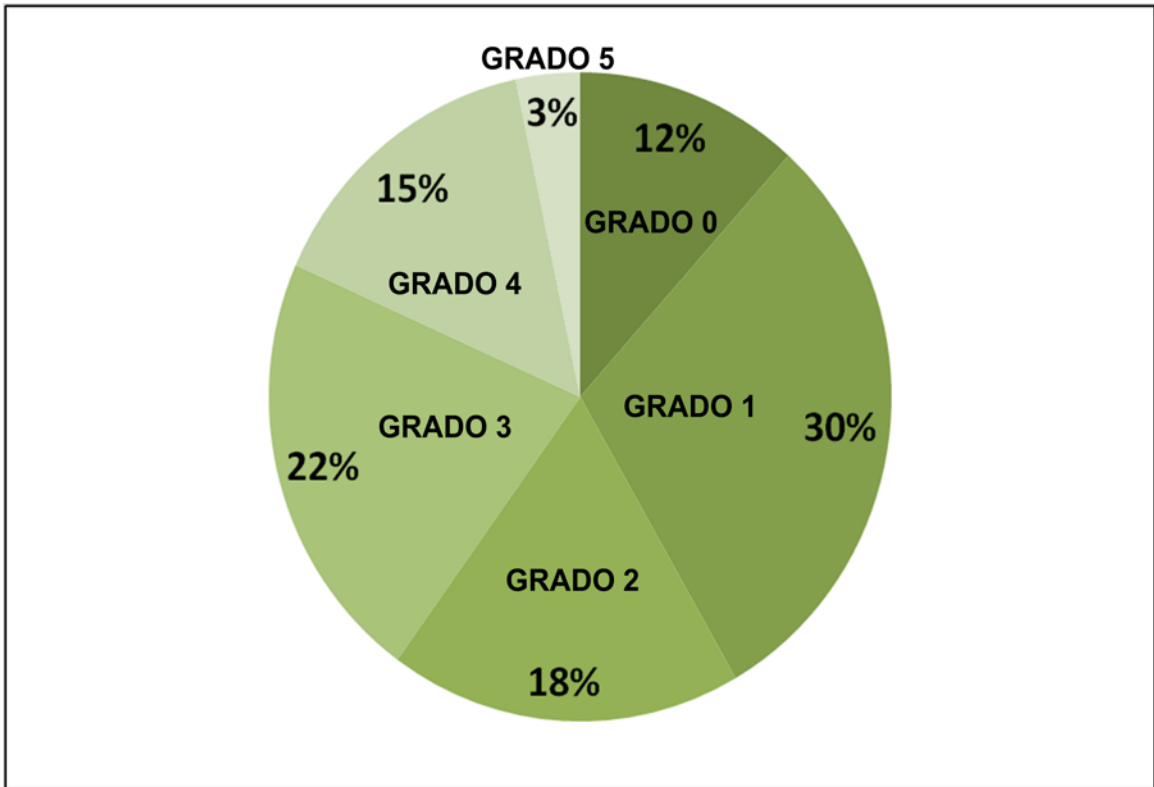
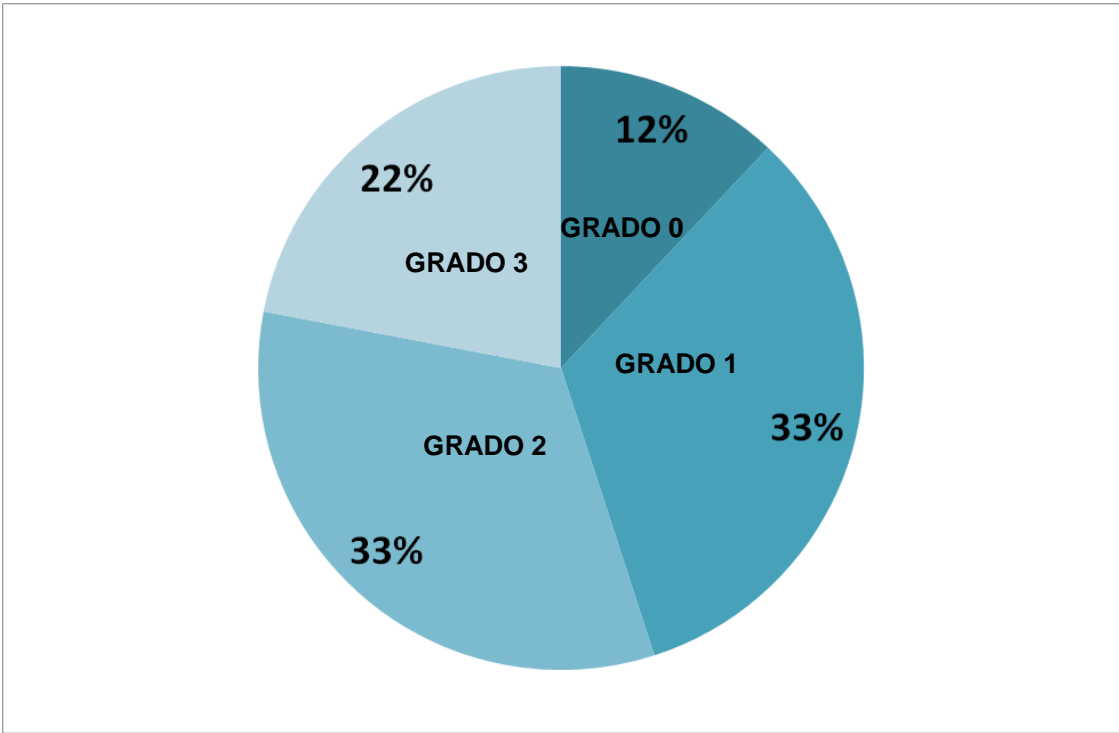


Figura 10: Distribuzione percentuale in gradi di steatosi soggettiva (sopra) e oggettiva (sotto)

I soggetti sono stati suddivisi in sottogruppi in base al grado di steatosi soggettiva. E' stata utilizzata la steatosi soggettiva perché essendo poco numeroso il campione (60 soggetti) utilizzare le 6 classi di steatosi oggettiva avrebbe ridotto eccessivamente la numerosità dei sottogruppi. Alla regressione lineare semplice si evidenzia che l'entità della steatosi correla con obesità (globale e viscerale), insulino-resistenza, numero dei fattori della sindrome metabolica, compenso glicemico (HbA1c), pressione arteriosa diastolica, leucociti, fibrinogeno, leptina (espressa come logaritmo in base 10 della concentrazione), hsPCR e inversamente con HDL-colesterolo. Non vi è invece correlazione con i marcatori di vasculopatia funzionale e anatomica. (Tabella 8).

	Steatosi assente (N = 7)	Steatosi grado 1 (N = 20)	Steatosi grado 2 (N = 20)	Steatosi grado 3 (N = 13)	p
Età (anni)	67 ± 3	65 ± 6	65 ± 9	64 ± 8	0.421
Sesso (M/F)	4/3	11/9	8/12	2/10	0,031*
BMI (Kg/m²)	28.5 ± 4.9	30.7 ± 5.6	33.1 ± 5.3	37 ± 4.5	< 0.001*
Waist (cm)	94.8 ± 11	104.7 ± 8.4	108.5 ± 11.7	115.2 ± 10	< 0.001*
Hip (cm)	97.3 ± 14.5	108.6 ± 8.4	111.9 ± 10.9	117.8 ± 6.7	< 0.001*
Waist/Hip	0.98 ± 0.14	0.97 ± 0.03	0.97 ± 0.07	0.96 ± 0.07	0.513
Numero fatt. SMet	2.5 ± 0.8	3.2 ± 0.7	3.7 ± 0.9	3.75 ± 0.9	0.001*
PAS (mmHg)	144 ± 25	149 ± 17	147 ± 14	140 ± 9.5	0.339
PAD (mmHg)	83.5 ± 6	86.5 ± 9.5	89.5 ± 6	93 ± 10.5	0.007*
Glicemia (mg/dl)	143 ± 33	163 ± 37	164 ± 31	186 ± 54	0.044*
Insulinemia	7.18 ± 5.1	10.8 ± 6.4	13.7 ± 5.7	20.3 ± 12.8	< 0.001*
HOMA	2.5 ± 1.9	3.9 ± 2.1	5.7 ± 3.1	10.2 ± 8.5	< 0.001*
HbA1c	6.9 ± 0.5	7.5 ± 0.8	7.7 ± 1	8.7 ± 1.7	< 0.001*
Durata diabete	13 ± 12.8	9.5 ± 8.5	10.3 ± 8.4	10.4 ± 8.8	0.770
AST/ALT	1.29 ± 0.39	0.91 ± 0.22	0.92 ± 0.30	1.03 ± 0.40	0.326
Colest tot. (mg/dl)	188 ± 30	186 ± 30	186 ± 22	192 ± 19	0.662
Colest HDL (mg/dl)	67 ± 28	57 ± 13	52 ± 13	53 ± 6	0.040*
Trigliceridi	104 ± 33	131 ± 58	153 ± 82	152 ± 53	0.081
Log Leptina	1.02 ± 0.56	1.14 ± 0.30	1.28 ± 0.31	1.43 ± 0.23	0.006*
Leucociti	5.53 ± 1.87	6.39 ± 1.64	7.25 ± 1.37	6.99 ± 1.48	0.025*
Fibrinogeno	3.08 ± 0.86	3.29 ± 0.75	4.05 ± 1.19	3.85 ± 0.90	0.021*
Ferritina	100 ± 73	238 ± 186	163 ± 118	176 ± 94	0.995
hs PCR	2.73 ± 1.28	3.08 ± 2.95	6.52 ± 5.24	7.55 ± 7.88	0.009*
TNF α	5.61 ± 5.18	6.30 ± 4.28	7.07 ± 4.11	9.84 ± 4.45	0.098
FMD (%)	4.83 ± 2.79	5.09 ± 2.10	4.30 ± 1.76	5.19 ± 0.60	0.543
IMT medio (mm)	0.82 ± 0.21	0.93 ± 0.24	0.87 ± 0.23	0.85 ± 0.22	0.760
IMT max (mm)	1.14 ± 0.35	1.20 ± 0.32	1.17 ± 0.30	1.29 ± 0.21	0.391
Placca carot. (%)	43	65	50	67	0.644

Tabella 8: Regressione lineare tra gradi di steatosi soggettiva (variabile dipendente) e variabili cliniche e metaboliche

Alla regressione multipla, considerando i gradi di steatosi soggettiva come variabile dipendente e come variabili indipendenti HbA1c, waist o BMI, insulinemia o HOMA, correggendo per sesso, risulta che il compenso glicemico, l'insulino-resistenza e l'obesità viscerale (waist) sono tutti predittori indipendenti di steatosi epatica.

	p
HbA1c	0.031 *
BMI	0.083
HOMA	0.021 *
HbA1c	0.029 *
WAIST	0.015 *
HOMA	0.064
HbA1c	0.013 *
BMI	0.082
INSULINEMIA	0.013 *
HbA1c	0.017 *
WAIST	0.023 *
INSULINEMIA	0.042 *

Tabella 9: Regressione multipla tra gradi di steatosi soggettiva (variabile dipendente) e variabili cliniche e metaboliche.

Aggiungendo come variabile indipendente il numero di fattori della sindrome metabolica rimane come unico predittore del grado di steatosi il compenso glicemico espresso dall'emoglobina glicata e ai limiti della significatività gli indici di insulino resistenza (HOMA e insulinemia) se si utilizza il BMI come indicatore di obesità.

	p
HbA1c	0.013 *
BMI	0.460
HOMA	0.061 °
Num. fattori SMet	0.101
HbA1c	0.007 *
BMI	0.309
INSULINEMIA	0.058 °
Num. fattori SMet	0.173
HbA1c	0.017 *
WAIST	0.153
HOMA	0.100
Num. fattori SMet	0.234
HbA1c	0.010 *
WAIST	0.165
INSULINEMIA	0.071
Num. fattori SMet	0.193

Tabella 10: Regressione multipla tra gradi di steatosi soggettiva (variabile dipendente) e variabili cliniche e metaboliche incluso il numero di componenti della sindrome metabolica.

Tuttavia, considerando i gradi di steatosi soggettiva come variabile dipendente e come variabili indipendenti sesso, waist o BMI, insulinemia o HOMA, HbA1c, fibrinogeno, hs-PCR, log leptina rimangono significativi solo gli indicatori di insulino-resistenza (HOMA) p 0.035 e di obesità (BMI) p 0.033.

Coefficients:

	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t)
(Intercept)	-1.427709	0.994627	-1.435	0.1598
sex	0.358672	0.292261	1.227	0.2277
Log.Lept	-0.643529	0.571744	-1.126	0.2678
HOMA	0.056304	0.025771	2.185	0.0355 *
BMI.Kg.m2.	0.065808	0.029703	2.216	0.0331 *
HbA1C	0.133865	0.120931	1.107	0.2757
hs.PCR	-0.001733	0.030530	-0.057	0.9551
fibrinogeno	0.045046	0.170627	0.264	0.7933

La significatività delle correlazioni evidenziate utilizzando i gradi di steatosi soggettiva vengono confermate anche utilizzando i gradi di steatosi oggettiva. Il rapporto fegato/rene, da cui si calcola la steatosi oggettiva, correla significativamente con l'insulinemia, l'obesità viscerale, il compenso glicemico (HbA1c) (Figure 10-12).

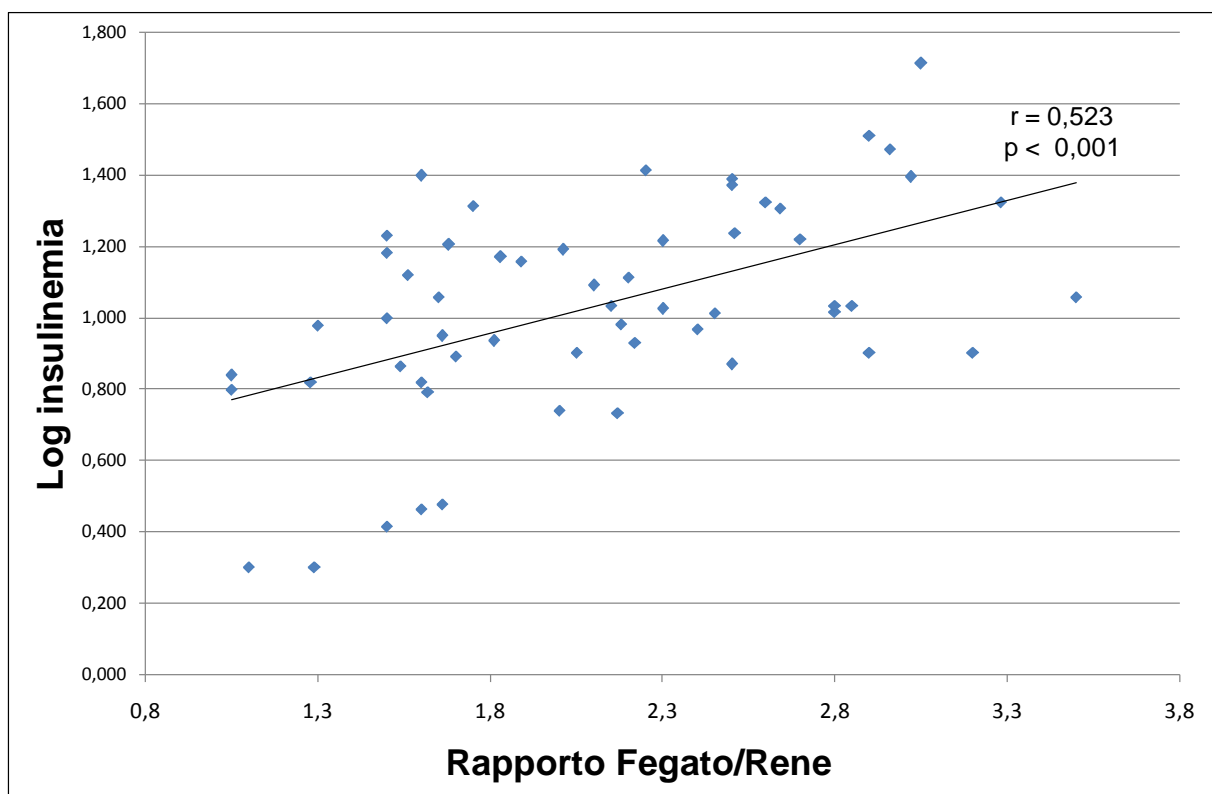


Figura 10: Correlazione rapporto fegato/rene e insulinemia

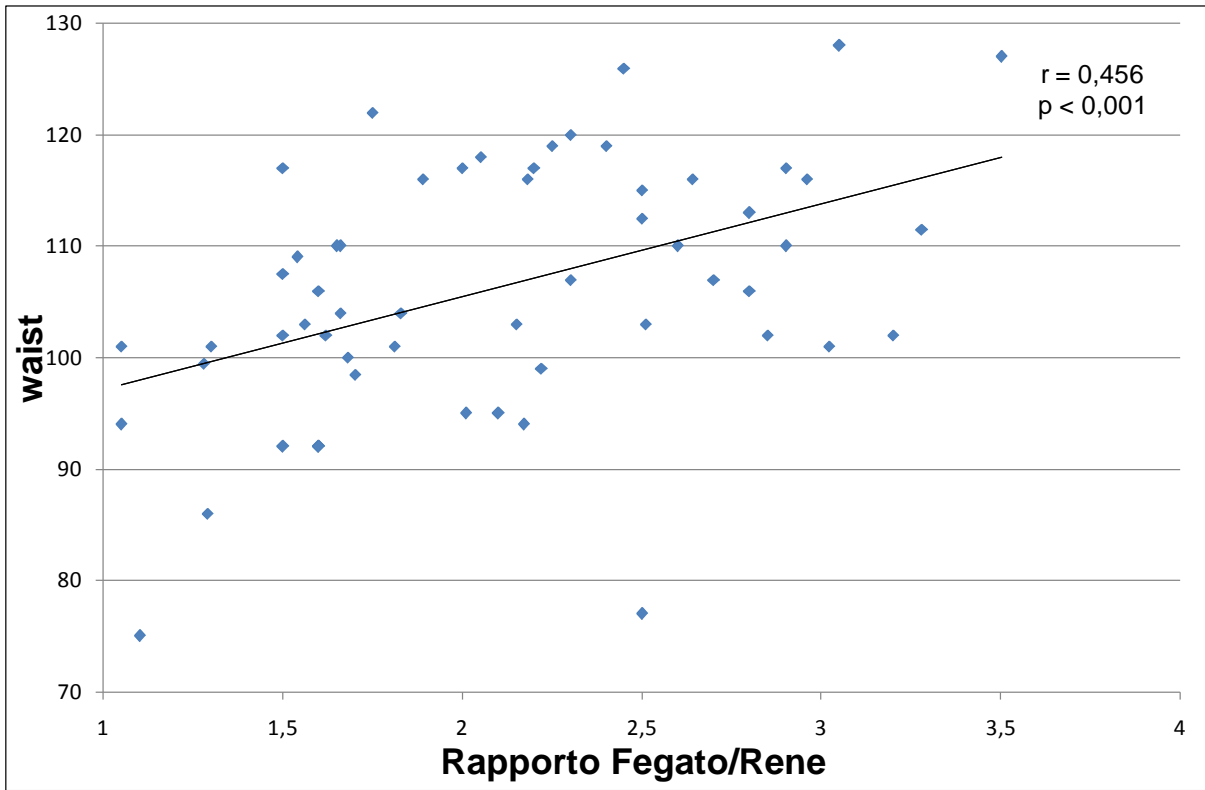


Figura 11: Correlazione rapporto fegato/rene e waist

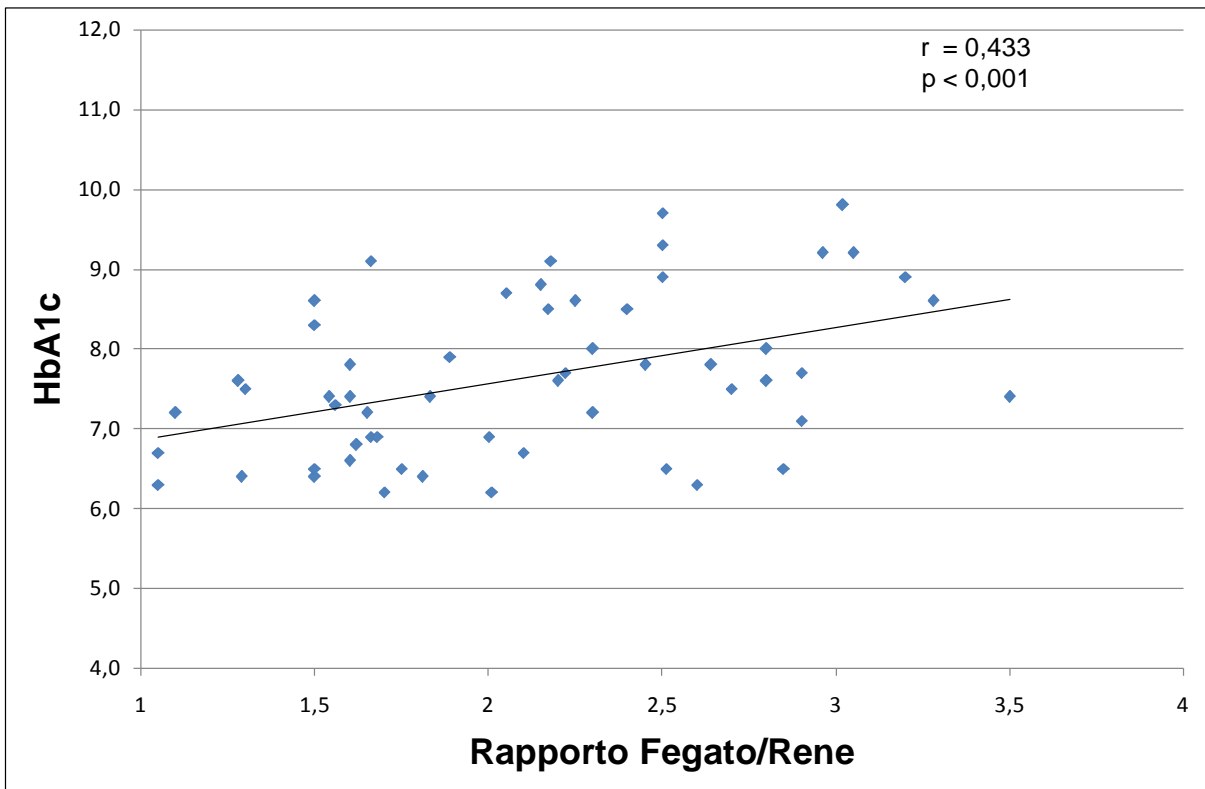


Figura 12: Correlazione rapporto fegato/rene e HbA1c

PREDIZIONE DEL GRADO DI STEATOSI SECONDO IL MODELLO STATISTICO “ORDERED PROBIT”

Il modello statistico Ordered Probit è un modello di regressione per dati ordinati (Aitchison and Silvey, 1957); considerando l'associazione tra alcune variabili indipendenti il modello descrive la probabilità del paziente di appartenere ad una determinata classe di steatosi.

Dalla rappresentazione in tabella si evince il numero di pazienti in cui vi è corrispondenza tra classificazione in base al modello statistico e reale classificazione in base all'ecografia (diagonale principale); in alto a destra sono i pazienti in cui il modello statistico ha sottostimato il grado di steatosi rispetto all'ecografia; in basso a sinistra sono i pazienti in cui il modello statistico ha sovrastimato il grado di steatosi rispetto all'ecografia.

Utilizzando come variabili dipendenti **HbA1c, waist e insulinemia**, la probabilità di corrispondenza tra elaborazione statistica e dato ecografico è del 57,6%, con errore di un grado del 39% (19% sovrastima, 20% sottostima); quindi nel 96,5% con scarto di un grado.

MODELLO STATISTICO	ECOGRAFIA				
		0	1	2	3
	0	2	0	0	0
	1	5	15	7	1
	2	0	4	11	5
	3	0	1	2	6

Applicando il Probit utilizzando come variabili dipendenti **sexso, HbA1c, numero fattori sindrome metabolica e insulinemia**, la probabilità di corrispondenza tra elaborazione statistica e dato ecografico è del 54,2%, con errore di un grado del 41% (17% sovrastima, 24% sottostima); quindi nel 95 % con scarto di un grado.

MODELLO STATISTICO	ECOGRAFIA				
		0	1	2	3
	0	2	1	0	0
	1	5	13	7	1
	2	0	4	11	6
	3	0	2	1	5

Applicando il Probit utilizzando come variabili dipendenti **sex**, **HbA1c**, **numero fattori sindrome metabolica**, **waist**, **HOMA**, **log Leptina**, la probabilità di corrispondenza tra elaborazione statistica e dato ecografico è del 59%, con errore di un grado del 39% (19% sovrastima, 20% sottostima); quindi nel 98% con scarto di un grado.

MODELLO STATISTICO	ECOGRAFIA			
	0	1	2	3
0	3	1	0	0
1	3	10	7	1
2	0	5	10	2
3	0	0	1	6

CORRELAZIONI TRA PARAMETRI METABOLICI E VASCOLARI

La leptina è risultata aumentata nel sesso femminile, correla con il grado di steatosi (p 0.006), l'obesità (BMI e waist) (p < 0.001), l'insulino-resistenza (HOMA e insulinemia) (p 0.015 e 0.005) (Figura 13), il numero dei fattori della sindrome metabolica (p 0.039), il fibrinogeno (Figura 14) (< 0.001) e IL6 (p 0.002).

Alla regressione multipla rimane significativa solo la correlazione con l'obesità e il sesso femminile.

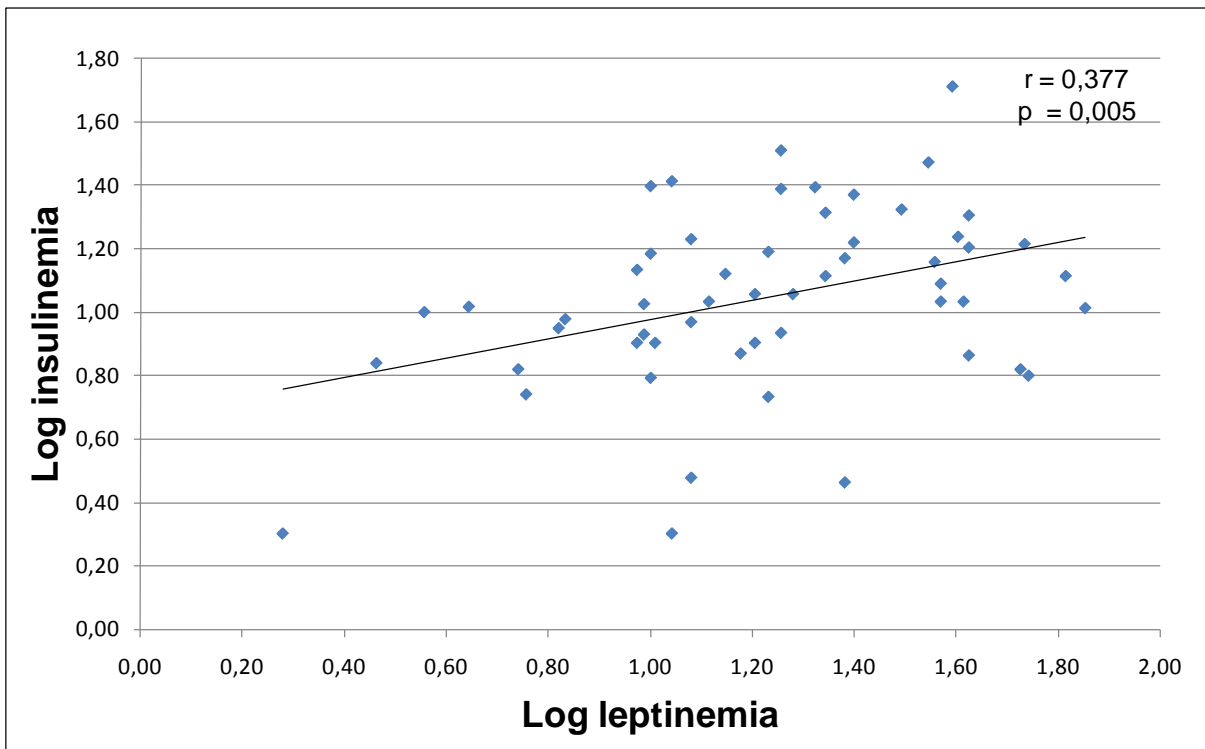


Figura 13: Correlazione tra leptinemia e insulinemia

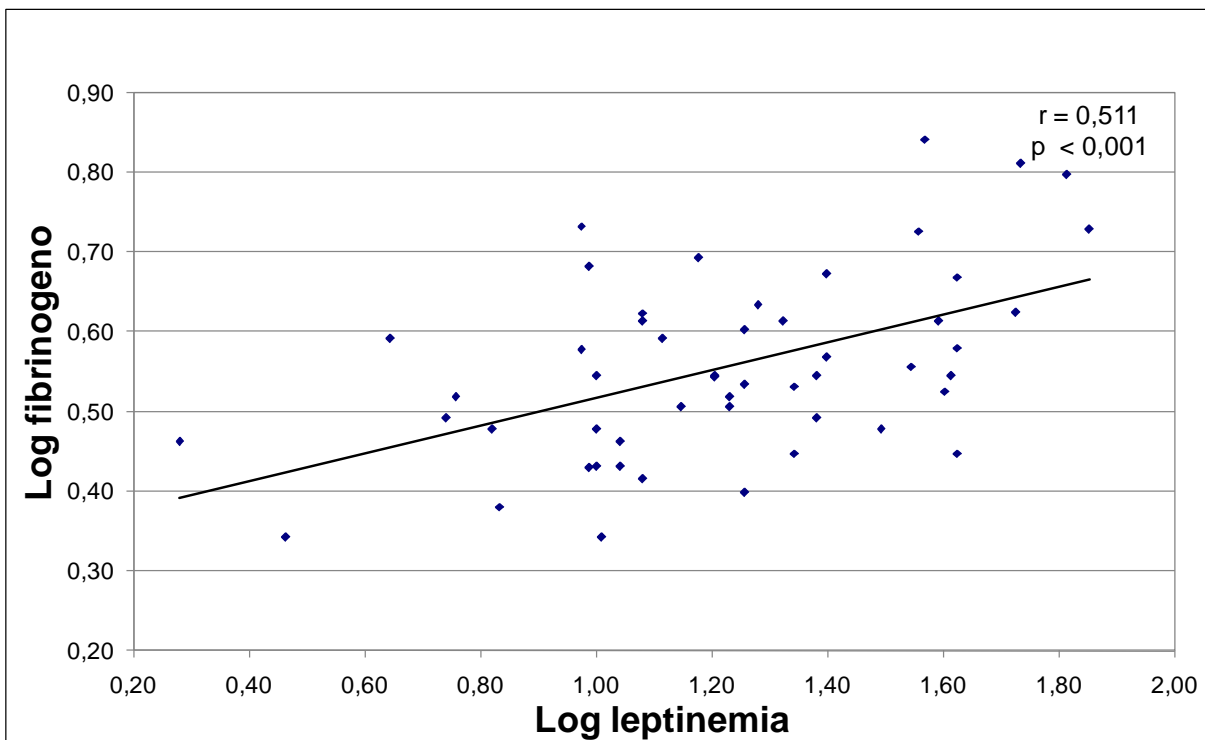


Figura 14: Correlazione tra leptinemia e fibrinogeno

La vasculopatia carotidea subclinica (IMT medio) alla regressione lineare correla con il sesso (IMT > nei maschi) ($p < 0.002$), ovviamente con l'IMT massimo ($p < 0.001$), la presenza di placca ($p < 0.001$) e il grado di stenosi carotidea ($p < 0.001$), con la presenza di retinopatia diabetica ($p < 0.003$). Risulta inoltre esservi una correlazione inversa con il logaritmo della leptina, tale correlazione è significativa se si considerano insieme entrambi i sessi ($p < 0.001$), suddividendo per sesso la correlazione non raggiunge la significatività (Figura 15-16).

La presenza di placca carotidea correla, alla regressione lineare, con IMT medio ($p < 0.001$), età ($p < 0.015$), sesso ($p < 0.001$), uricemia ($p < 0.034$), ai limiti con microalbuminuria ($p < 0.057$) e con IMT massimo ($p < 0.060$). Alla regressione multipla solo l'IMT medio rimane fattore predittivo indipendente ($p < 0.001$).

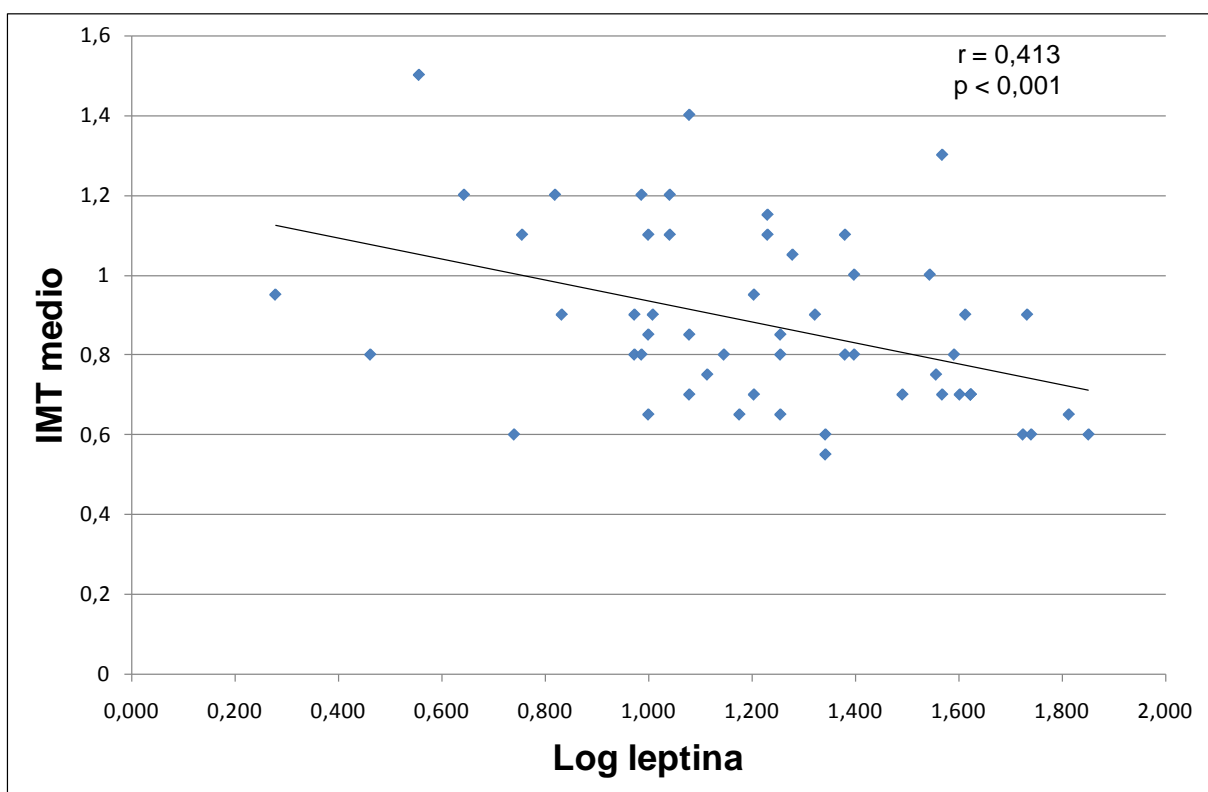


Figura 15: Relazione tra IMT medio e log leptina in tutta la popolazione valutata

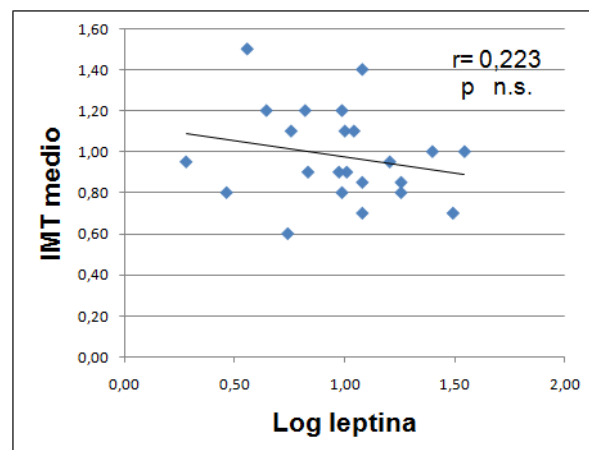
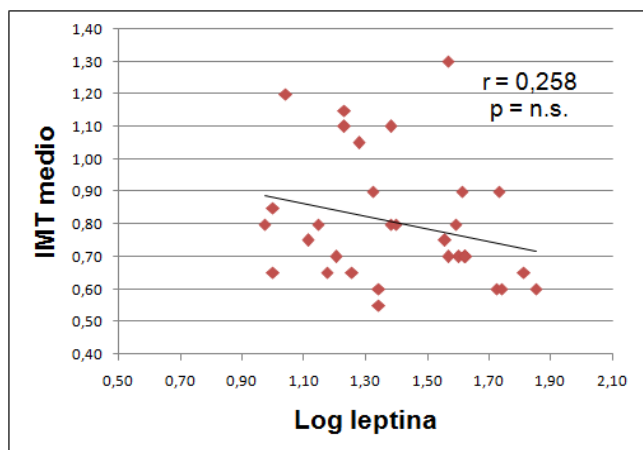


Figura 16: :Relazione tra IMT medio e log leptina nelle femmine (sinistra) e nei maschi (destra)

Applicando la regressione multipla considerando l'IMT medio come variabile dipendente risultano predittori indipendenti (dopo correzione per sesso, età, fumo, durata diabete, colesterolo HDL, pressione diastolica), i leucociti ($p < 0.001$) e la presenza di retinopatia diabetica ($p 0.019$).

Coefficients:

	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t)
(Intercept)	0.3107486	0.4229833	0.735	0.466358
età	0.0089295	0.0035178	2.538	0.014666 *
sex	-0.1957278	0.0512657	-3.818	0.000409 ***
fumo.no.ex.si	0.0753030	0.0372277	2.023	0.049063 *
durata.diabete	-0.0045900	0.0027978	-1.641	0.107859
PAD	-0.0034638	0.0028828	-1.202	0.235816
col.HDL	-0.0003364	0.0017244	-0.195	0.846217
leucociti	0.0618399	0.0173759	3.559	0.000892 ***
RD.si.no	0.1676630	0.0672613	2.493	0.016425 *

DISCUSSIONE

Con il presente studio ci siamo proposti innanzitutto di valutare, mediante una tecnica non invasiva quale l'ecografia, la prevalenza di steatosi epatica in un gruppo di pazienti diabetici e affetti da sindrome metabolica. Dai nostri dati tale prevalenza è risultata pari all'88%. Tale percentuale è di gran lunga superiore a quella riscontrata nella popolazione adulta sana, che è compresa tra il 10 ed il 25%, comunque in linea con studi di prevalenza in popolazioni selezionate, quali diabetici (112) e obesi (7). Una così alta prevalenza di steatosi epatica nei nostri pazienti conferma ulteriormente l'ipotesi di considerare la steatosi come la manifestazione epatica dello stato di insulino-resistenza che sta alla base della sindrome metabolica.

Fra i criteri diagnostici della sindrome metabolica, nella nostra casistica quello dell'obesità viscerale è risultato maggiormente predittivo per steatosi epatica, assieme a quello di insulino-resistenza espressa come HOMA (homeostasis model assessment).

L'utilizzo della classificazione quantitativa del grado di steatosi epatica (rapporto fegato/rene) associata alla classificazione soggettiva ha confermato le correlazioni metaboliche ottenute. I limiti però della tecnica ecografica sono l'incapacità di rilevare la presenza di necroinfiammazione e fibrosi che sono i fattori predittivi più importanti per l'evoluzione dell'epatopatia e che sembrano anche i più rilevanti nel definire il rischio cardiovascolare.

Scopo dello studio è stato inoltre quello di valutare se la presenza e il grado di steatosi epatica, sommati agli altri criteri della sindrome metabolica, possano apportare un rischio aggiuntivo cardiovascolare. A tal fine sono stati studiati nei nostri pazienti i marcatori precoci di malattia cardiovascolare quali lo spessore medio-intimale (IMT) e

le placche carotidee (marcatori di vasculopatia subclinica), i marcatori di flogosi, di trombogenesi e le citochine/adipochine (hs-PCR, fibrinogeno, IL6, TNF α , leptina) e l'FMD (Flow mediated dilation, indice di disfunzione endoteliale).

I dati in letteratura sono infatti contrastanti e risentono della tipologia di popolazione analizzata.

Numerosi studi hanno evidenziato l'esistenza di una relazione tra NAFLD e cardiovasculopatia. Voltzke et al (113) hanno dimostrato, attraverso uno studio osservazionale condotto su 4222 soggetti eterogenei, che i pazienti con steatosi (determinata ecograficamente) hanno rispetto ai controlli un IMT maggiore ed una maggior prevalenza di placche carotidee; tra i pazienti con steatosi ci sono più pazienti diabetici (19% vs 4.5%) e il valore di BMI è nettamente superiore (30.1 vs 26.1 kg/m²). Brea et al (114), in uno studio osservazionale condotto su 80 soggetti, hanno evidenziato che i pazienti con NAFLD (determinata mediante ecografia) hanno IMT maggiore (0.70 vs 0.54 mm) e presenza di placche carotidee doppia (50% vs 25%) rispetto ai controlli, ma hanno anche maggior prevalenza di sindrome metabolica (80% vs 20%) e di diabete (17.5% vs 0%) e maggiore BMI (30.1 vs 26.1 kg/m²). Targher in uno studio condotto su 85 soggetti sani non obesi (115) ha evidenziato che nel gruppo di pazienti con steatosi (determinata con ecografia e confermata con TC) si riscontrano valori di IMT più elevati (IMT 1.18 vs 0.94); il valore di IMT inoltre correla con il grasso viscerale e le differenze tra i 2 gruppi vengono abolite correggendo per il grasso viscerale. Il gruppo di Targher in 2 differenti studi (116) e (117) ha inoltre dimostrato che la severità della NAFLD (grado di steatosi epatica, necroinfiammazione e fibrosi) si associa con aterosclerosi carotidea precoce (aumento dell'IMT carotideo), indipendentemente dai classici fattori di rischio (presenza di sindrome metabolica e diabete). Anche in adolescenti obesi il grado di

steatosi è risultato correlato con l'IMT carotideo (118). Aygun et al (119) hanno dimostrato, in uno studio condotto su 80 soggetti, che pazienti con NAFLD (evidenziata con biopsia epatica) hanno maggior prevalenza di sindrome metabolica e di diabete e valori più elevati di IMT medio (0.64 vs 0.54 mm) e massimo (0.84 vs 0.7 mm) rispetto ai controlli.

La correlazione tra le varie adipochine e i marcatori di vasculopatia subclinica è tuttora non chiara. E' stata evidenziata un'associazione tra leptinemia e IMT carotideo in soggetti giovani, non diabetici, con differenti gradi di obesità; tale associazione sembra mediata dall'obesità scomparendo la correlazione IMT-leptinemia se corretta per BMI (31). Più che il valore di leptina in sè, parrebbe importante il rapporto leptina/adiponectina, o il valore di adiponectina per sè, nel determinare l'IMT, tale correlazione persiste anche dopo correzione per grado di obesità (32). In maschi sani, è stata dimostrata una correlazione tra elevato rapporto leptina/adiponectina e IMT mentre non vi è alcuna correlazione con la leptina (120).

Nel nostro studio non abbiamo potuto misurare i livelli di adiponectina. Il nostro dato di una correlazione inversa tra log di leptina e IMT medio risulta sorprendente, sia pure ottenuto includendo pazienti di entrambi i sessi. E' possibile che la casistica selezionata da noi studiata (pazienti con diabete mellito tipo 2 e sindrome metabolica) esibisca caratteristiche peculiari ed una particolare coesistenza di fattori di rischio non paragonabili a quelle di altri studi, tali comunque da offuscare il ruolo della leptina.

Per quanto riguarda gli studi sui pazienti con diabete di tipo 2, Targher et al. (13) hanno dimostrato in uno studio osservazionale, condotto su 2392 soggetti, che la NAFLD è molto frequente (69.5%), ed è associata a maggior prevalenza di cardiovascular disease - CVD (intesa come coronarica, carotidea e periferica). Il tipo di studio tuttavia non permette di stabilire una relazione causa effetto tra NAFLD e

CVD. In un ulteriore studio osservazionale condotto su 800 soggetti diabetici, Targher et al. (73) hanno dimostrato maggior prevalenza di CVD in pazienti affetti da steatosi; tuttavia la relazione non è più significativa dopo aggiustamento per i criteri della sindrome metabolica.

Nel Valpolicella Diabetes Heart Study, Targher et al. (71-88) hanno descritto una maggior prevalenza di NAFLD nei soggetti che sviluppavano cardiovasculopatia; questi pazienti hanno anche una maggior prevalenza di sindrome metabolica, e l'associazione tra cardiovasculopatia e NAFLD viene leggermente attenuata ma non eliminata dopo correzione per la presenza di sindrome metabolica.

Ha raggiunto conclusioni diverse un recente lavoro di Mc Kimmie che ha valutato una popolazione di 623 soggetti diabetici o con familiarità per diabete, evidenziando come l'associazione di steatosi epatica (valutata alla TAC con il rapporto fegato/milza) e malattia cardiovascolare (valutata con misurazione ecografica di IMT carotideo e quantificazione alla TAC del calcio parietale arterioso a livello di coronarie, carotidi e aorta) sia un epifenomeno; in tale popolazione infatti non vi è correlazione tra IMT carotideo o calcio aortico e presenza di steatosi (121).

Nella nostra casistica abbiamo riscontrato una prevalenza di NAFLD pari all' 88%, un IMT carotideo medio di 0.88 mm e massimo pari a 1.20 mm, una prevalenza di placche aterosclerotiche carotidiche del 63%. Questi dati sono in accordo con i risultati evidenziati dagli studi precedenti. Nella nostra popolazione non abbiamo però evidenziato una associazione significativa fra presenza e grado di steatosi epatica e IMT, né fra steatosi e placche carotidiche.

Tali risultati sembrano in contraddizione con i numerosi dati presenti in letteratura ma che si riferiscono soprattutto a soggetti non diabetici o a popolazioni miste, mentre sono in accordo con il sopracitato lavoro di Mc Kimmie condotto in soggetti diabetici.

Va infatti considerato che la popolazione del nostro studio rappresenta un campione molto selezionato, e alquanto differente rispetto alle popolazioni degli studi sopracitati, in quanto nella nostra casistica tutti i pazienti erano affetti da diabete di tipo 2 e la quasi totalità di essi soddisfaceva i criteri della sindrome metabolica; presentavano inoltre valori di BMI e circonferenza addominale molto elevati. Negli studi sopracitati i pazienti simili per caratteristiche a quelli del nostro studio rappresentano solo un piccolo sottogruppo (generalmente sempre nel gruppo dei casi ma non nei controlli). D'altra parte nel nostro studio, vista la relativamente limitata numerosità della casistica, non è stato possibile confrontare i pazienti diabetici con sindrome metabolica e che presentavano steatosi epatica, con pazienti senza steatosi, quindi non è stato possibile avere un gruppo di controllo sia pure diabetico, in quanto troppo poco numeroso rispetto ai casi (7 vs 53).

Sembrerebbe tuttavia che la presenza di diabete mellito e/o la coesistenza di numerosi fattori della sindrome metabolica annulli le correlazioni tra grado di steatosi e IMT. E' probabile che il "peso" del diabete di tipo 2 e degli associati fattori di rischio cardiovascolari prevalga sull'eventuale associazione tra grado di steatosi epatica e IMT.

Inoltre nel nostro studio la circonferenza addominale ed il BMI sono risultati strettamente associati con la steatosi; la quasi totalità dei pazienti presentava valori chiaramente patologici di circonferenza addominale (87%) e di BMI (64% obesi, 28% con sovrappeso, e solo il 8% dei pazienti con normopeso). Studi in letteratura hanno infatti dimostrato che il BMI è un forte predittore indipendente di steatosi (103), e che la relazione tra NAFLD e spessore medio-intimale carotideo ha come anello di congiunzione il grasso viscerale (115). Nella nostra popolazione comunque la

coesistenza di insulino-resistenza, obesità e compenso metabolico (emoglobina glicata), sono in grado di predire la steatosi e la sua gravità.

Per quanto riguarda la valutazione della funzione endoteliale, l'FMD nella nostra popolazione è risultato pari a $5.02 \pm 1.81\%$; sovrapponibile al valore di FMD misurato ($4.9 \pm 2.4\%$) in un altro gruppo di soggetti diabetici, paragonabile per età (media di 65 anni) alla nostra popolazione e non selezionati per sindrome metabolica (dati non pubblicati). Tale valore risulta invece ridotto rispetto a quello rilevato in una popolazione sana confrontabile per età ($7.9 \pm 3.1\%$) (122). In letteratura esistono molti studi recenti (del 2008) che hanno valutato la funzione endoteliale in relazione alla sindrome metabolica e al diabete. I risultati non sono univoci, ma avvalorano la correlazione dell'alterata FMD con il diabete (manifesto o familiarità) piuttosto che con la sindrome metabolica.

Nello studio di Meyer (123) viene rilevato come la riduzione dell'FMD nella popolazione diabetica non sia imputabile ai concomitanti fattori di rischio della sindrome metabolica (ipertensione e dislipidemia), quanto piuttosto al diabete mellito (correlazione tra FMD e durata di malattia).

Nello studio di Alizadeh (124) è stata studiata una popolazione di 62 pazienti con diabete e dislipidemia, dividendo la popolazione in base ai criteri della sindrome metabolica si evidenzia che i valori di IMT e hs-PCR correlano con il numero di fattori della sindrome, mentre il valore di FMD non viene influenzato dal numero di criteri della sindrome metabolica.

In un altro studio (125) che ha valutato soggetti giovani non diabetici con sindrome metabolica, l'FMD non correla con la sindrome metabolica, ma nel sottogruppo di soggetti con FMD ridotto la sindrome metabolica correla con un aumentato IMT.

Uno studio italiano (126) ha confrontato soggetti con sindrome metabolica \pm familiarità per diabete, evidenziando una ridotta FMD solo nei soggetti con familiarità per diabete, indipendentemente quindi dalla sindrome metabolica. In contrasto sono invece i risultati di un altro studio italiano (127) in cui l'FMD correla con i fattori della sindrome metabolica, in particolare ipertensione arteriosa e alterata glicemia a digiuno.

E' stato dimostrato che pazienti non diabetici con NAFLD hanno un significativo calo dell'FMD se comparati con soggetti sani e che questa riduzione correla con le caratteristiche istologiche della NAFLD indipendentemente da età, sesso, BMI, indice HOMA ed altri componenti della sindrome metabolica (70).

Nel nostro studio non essendoci un gruppo di controllo ed essendo tutti i pazienti diabetici e ipertesi il valore dell'FMD risulta omogeneamente ridotto. La presenza di steatosi epatica non sembra influenzare ulteriormente tale valore alterato dipendente probabilmente quindi soprattutto da ipertensione e diabete.

Abbiamo infine rilevato una correlazione tra gradi di steatosi e hsPCR, fibrinogeno e leptina; tali correlazioni non si mantengono significative alla regressione multipla correggendo per obesità e insulino-resistenza. Perciò, i dati relativi al ruolo di fattori legati all'infiammazione e grado di steatosi, nel nostro studio, non appaiono conclusivi.

Va comunque considerato che la nostra ricerca presenta il limite di essere basato su un campione poco numeroso, e di essere di tipo osservazionale. Perciò, senza un follow-up, esso non permette di stabilire una relazione causa-effetto e una relazione temporale tra NAFLD e sviluppo di cardiovasculopatia. Utile sarebbe ampliare la casistica, seguire nel tempo i pazienti per valutare se la steatosi (e la sua gravità) sono predittori di sviluppo di cardiovasculopatia.

Appare interessante la possibilità di predire, con un discreto grado di precisione, il grado di steatosi in base al numero e/o al tipo di criteri della sindrome metabolica. Tale predizione può quindi essere utilizzata sia pure in modo semiquantitativo anche sul piano clinico. Una migliore quantificazione del grado di steatosi epatica con altre metodologie, ad esempio con TC o RMN, potrebbe aumentarne il grado di precisione. In conclusione, il nostro studio osservazionale indica che, nel diabete tipo 2 e con sindrome metabolica, il grado di steatosi epatica è strettamente correlato al grado di obesità viscerale e all'insulino-resistenza, mentre esso non predice il grado di vasculopatia precoce come evidenziato dall'IMT. Lo studio fornisce inoltre uno strumento per la stima (semi)quantitativa del grado di steatosi che potrebbe avere una rilevanza ed utilità clinica.

BIBLIOGRAFIA

- 1 Alba LM, Lindor K. Review article: non alcoholic fatty liver disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2003; 17, 977-986.
- 2 Neuschwander-Tetri BA, Caldwell SH. Nonalcoholic steatohepatitis: summary of an AASLD Single Topic Conference. *Hepatology*. 2003; 37:1202-1219.
- 3 Clark JM, Brancati FL, Diehl AM. Non alcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* 2002; 122: 1649-1657.
- 4 Caldwell SH, Crespo DM. The spectrum expanded: cryptogenetic cirrhosis and the natural history of non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol*. 2004;40:578-584.
- 5 Matteoni CA, Younossi ZM, Gramlich T, Boparai N, Liu YC, McCullough AJ: Nonalcoholic fatty liver disease. A spectrum of clinical and pathological severity. *Gastroenterology* 1999; 116, 1413-1419.
- 6 Fan JG, Zhu J, Li XJ et al. Prevalence of and risk factors for fatty liver in a general population of Shanghai, China. *J Hepatol*. 2005; 43:508-514.
- 7 McCullough AJ. Update on nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Gastroenterol*. 2002; 34(3):255-62.
- 8 Bellentani S, Saccoccio G, Masutti F, Croce LS, Brandi G, Sasso F, et al. Prevalence of and risk factors for hepatic steatosis in Northern Italy. *Ann Intern Med*. 2000; 132:112-117.
- 9 Dixon JB, Bhathal PS, O'Brien PE. Nonalcoholic fatty liver disease: predictors of non alcoholic steatohepatitis and liver fibrosis in the severely obese. *Gastroenterology*. 2001; 121:91-100.
- 10 Jimba S, Nakagami T, Takahashi M, Wakamatsu T, Hirota Y, Iwamoto Y, et al. Prevalence of non-alcoholic fatty liver disease and its associations with impaired glucose metabolism in Japanese adults. *Diabet Med*. 2005; 22:1141-1145.
- 11 Angulo P: Non-alcoholic fatty liver disease, *NEJM* 2002; vol. 346: 1221-1231.
- 12 Kojima, Watanabe N, Numata M et al. Increase in the prevalence of fatty liver in Japan over the past 12 years: analysis of clinical background. *J Gastroenterol*. 2003; 38: 954-961.
- 13 Targher G, Bertolini L, Padovani R, Rodella S, Tessari R, Zenari L, Day C, Arcaro G: Prevalence of Non-alcoholic fatty liver disease and its association with cardiovascular disease among type 2 diabetic patients. *Diabetes Care* 2007; 30: 1212-1218.
- 14 Adams LA, Lindor KD. Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Ann Epidemiol*. 2007; 17:863-869.

- 15 Marchesini G, Bugianesi E, Forlani G, Cerrelli F, Lenzi M, Manini R et al. Nonalcoholic fatty liver, steatohepatitis, and the metabolic syndrome. *Hepatology*. 2003; 37:917-923.
- 16 Petrides AS, Stanley T, Matthews DE, Vogt C, Bush AJ, Lambeth H. Insulin resistance in cirrhosis: prolonged reduction of hyperinsulinemia normalizes insulin sensitivity. *Hepatology*. 1998; 28:141-149.
- 17 Day CP, James OF. Steatohepatitis: a tale of two "hits"? *Gastroenterology*. 1998;114(4):842-5.
- 18 Adams LA, Angulo P, Lindor KD. Nonalcoholic fatty liver disease. *CMAJ*. 2005;172(7):899-905.
- 19 Wei Y, Rector RS, Thyfault PJ, Ibdah JA. Nonalcoholic fatty liver disease and mitochondrial dysfunction. *World J Gastroenterol* 2008; 14(2): 193-199
- 20 Chitturi S, Farrell G, Frost L, Kriketos A, Lin R, Fung C, et al. Serum leptin in NASH correlates with hepatic steatosis but not fibrosis: a manifestation of lipotoxicity? *Hepatology*. 2002;36(2):403-9.
- 21 Unger RH, Orci L. Diseases of liporegulation: new perspective on obesity and related disorders. *FASEB J*. 2001;15(2):312-21. Review.
- 22 Sinha MK, Caro JF. Clinical aspect of leptin. *Vitam Horm*. 1998; 54:1-30.
- 23 LinksNagao K, Inoue N, Ujino Y, Higa K, Shirouchi B, Wang YM, Yanagita T. Effect of leptin infusion on insulin sensitivity and lipid metabolism in diet-induced lipodystrophy model mice. *Lipids Health Dis*. 2008. 18;7(1):8.
- 24 Tilg H, Hotamisligil GS. Nonalcoholic fatty liver disease: Cytokine-adipokine interplay and regulation of insulin resistance. *Gastroenterology*. 2006;131(3):934-45. Review
- 25 Fishman S, Muzumdar RH, Atzmon G, Ma X, Yang X, Einstein FH, et al. Resistance to leptin action is the major determinant of hepatic triglyceride accumulation in vivo. *FASEB J*. 2007;21(1):53-60.
- 26 Ikejima K, Okumura K, Lang T, Honda H, Abe W, Yamashina S, et al. The role of leptin in progression of non-alcoholic fatty liver disease. *Hepatol Res*. 2005;33(2):151-4.
- 27 Annuzzi G, Giacco R, Patti L, Bozzetto L, Viscovo D, Rivellese AA. Low plasma leptin levels in well controlled type 2 diabetes are not related to body fat mass and whole-body insulin resistance. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2008;18(7):e35-6.
- 28 Cho YK, Lee WY, Oh SY, Park JH, Kim HJ, Park DI, Sohn CI, Jeon WK, Kim BI, Kim SW, Oh KW, Yun EJ, Oh ES. Factors affecting the serum levels of adipokines in Korean male patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatogastroenterology*. 2007;54(77):1512-6.
- 29 Aller R, de Luis DA, Fernandez L, Calle F, Velayos B, Olcoz JL, Izaola O, Sagrado MG, Conde R, Gonzalez JM. Influence of insulin resistance and adipokines in the grade of steatosis of nonalcoholic fatty liver disease. *Dig Dis Sci*. 2008;53(4):1088-92.

- 30 Baranova A, Gowder SJ, Schlauch K, Elariny H, Collantes R, Afendy A, Ong JP, Goodman Z, Chandhoke V, Younossi ZM. Gene expression of leptin, resistin, and adiponectin in the white adipose tissue of obese patients with non-alcoholic fatty liver disease and insulin resistance. *Obes Surg.* 2006;16(9):1118-25.
- 31 Ciccone M, Vettor R, Pannacciulli N, Minenna A, Bellacicco M, Rizzon P, Giorgino R, De Pergola G. Plasma leptin is independently associated with the intima-media thickness of the common carotid artery. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 2001;25(6):805-10.
- 32 Norata GD, Raselli S, Grigore L, Garlaschelli K, Dozio E, Magni P, Catapano AL. Leptin:adiponectin ratio is an independent predictor of intima media thickness of the common carotid artery. *Stroke.* 2007;38(10):2844-6.
- 33 Reis JP, Macera CA, Wingard DL, Araneta MR, Lindsay SP, Marshall SJ. The relation of leptin and insulin with obesity-related cardiovascular risk factors in US adults. *Atherosclerosis.* 2008;200(1):150-60.
- 34 Brennan AM, Li TY, Kelesidis I, Gavrilu A, Hu FB, Mantzoros CS. Circulating leptin levels are not associated with cardiovascular morbidity and mortality in women with diabetes: a prospective cohort study. *Diabetologia.* 2007;50:1178–1185.
- 35 Tsochatzis E, Papatheodoridis GV, Archimandritis AJ. The evolving role of leptin and adiponectin in chronic liver diseases. *Am J Gastroenterol.* 2006;101(11):2629-40.
- 36 Xu A, Wang Y, Keshaw H, Xu LY, Lam KS, Cooper GJ. The fat-derived hormone adiponectin alleviates alcoholic and nonalcoholic fatty liver diseases in mice. *J Clin Invest J Clin Invest.* 2003;112(1):91-100.
- 37 Musso G, Gambino R, Durazzo M, et al. Adipokines in NASH: postprandial lipid metabolism as a link between adiponectin and liver disease. *Hepatology* 2005; 42:1175.
- 38 Hui JM, Hodge A, Farrell GC, Kench JG, Kriketos A, George J. Beyond insulin resistance in NASH: TNF-alpha or adiponectin? *Hepatology.* 2004;40(1):46-54.
- 39 Kaser S, Moschen A, Cayon A, Kaser A, Crespo J, Pons-Romero F, Ebenbichler CF, Patsch JR, Tilg H. Adiponectin and its receptors in non-alcoholic steatohepatitis. *Gut.* 2005;54(1):117-21.
- 40 Muse ED, Obici S, Bhanot S, Monia BP, McKay RA, Rajala MW. Role of resistin in diet-induced hepatic insulin resistance. *J Clin Invest.* 2004;114(2):232-9.
- 41 Bokarewa M, Nagaev I, Dahlberg L, Smith U, Tarkowski A. Resistin, an adipokine with potent proinflammatory properties. *J Immunol.* 2005;174(9):5789-95.
- 42 Pagano C, Soardo G, Pilon C, Milocco C, Basan L, Milan G et al. Increased serum resistin in nonalcoholic fatty liver disease is related to liver disease severity and not to insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006;91(3):1081-6.
- 43 Calabro P, Chang DW, Willerson JT, Yeh ETH. Release of C-reactive protein in response to inflammatory cytokines by human adipocytes: linking obesity to vascular inflammation. *J Am Coll Cardiol* 2005; 20:1112-1113.

- 44 Ridker PM, Stampfer MJ, Rifai N. Novel risk factors for systemic atherosclerosis. *JAMA* 2001;285:2481-2485.
- 45 Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 2002;420:868-874.
- 46 Ridker PM, Wilson PWF, Grundy SM. Should C-reactive protein be added to metabolic syndrome and to assessment of global cardiovascular risk? *Circulation* 2004;109:2818-2825.
- 47 Florez H, Castillo-Florez S, Mendez A, Goldberg R. C-reactive protein is elevated in obese patients with the metabolic syndrome. *Diabetes Res Clin Pract.* 2006;71(1):92-100.
- 48 Santos AC, Lopes C, Guimaraes JT, Barros H. Central obesity as a major determinant of increased high-sensitivity C-reactive protein in metabolic syndrome. *Int J Obes* 2005; 29 (12): 1452-6.
- 49 Timpson NJ, Lawlor DA, Smith GD et al. C-reactive protein and its role in metabolic syndrome: mendelian randomisation study. *Lancet* 2005; 366: 1954-59.
- 50 Yoneda M, Mawatari H, Fujita K, Iida H, Yonemitsu K, et al, High-sensitivity C-reactive protein is an independent clinical feature of nonalcoholic steatohepatitis (NASH) and also of the severity of fibrosis in NASH. *J Gastroenterol.* 2007;42(7):573-82.
- 51 Ma KL, Ruan XZ, Powis SH, Chen Y, Moorhead JF, Varghese Z. Inflammatory stress exacerbates lipid accumulation in hepatic cells and fatty livers of apolipoprotein E knockout mice. *Hepatology* 2008;48 (3):770-81.
- 52 Harrison S, Diehl A.M: Fat and liver, a molecular overview. *Seminars in gastrointestinal disease.* 2002; 3-16.
- 53 Sorbi D, Boynton J, Lindor KD. The ratio of aspartate aminotransferase to alanine aminotransferase: potential value in differentiating non-alcoholic steatohepatitis from alcoholic liver disease. *Am J Gastroenterol* 1999; 94:1018-22.
- 54 Mofrad P, Contos MJ, Haque M, Sargeant C, Fischer RA, Luketic Va et al. Clinical and histologic spectrum of nonalcoholic fatty liver disease associated with normal ALT value. *Hepatology* 2003; 37:1286-92.
- 55 Saadeh S, Younossi ZM, Remer EM, Gramlich T, Ong JP, Hurley M, Mullen KD, Cooper JN, Sheridan MJ. The utility of radiological imaging in nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology.* 2002;123(3):745-50.
- 56 Longo R, Ricci C, Masutti F, Vidimari R, Crocè LS, Bercich L, Tiribelli C, Dalla Palma L. Fatty infiltration of the liver. Quantification by ¹H localized magnetic resonance spectroscopy and comparison with computed tomography. *Invest Radiol.* 1993;28(4):297-302.
- 57 Longo R, Pollesello P, Ricci C, Masutti F, Kvam BJ, Bercich L, Crocè LS, Grigolato P, Paoletti S, de Bernard B, et al. Proton MR spectroscopy in quantitative in vivo determination of fat content in human liver steatosis. *J Magn Reson Imaging.* 1995;5(3):281-5.

- 58 Joy D, Thava VR, Scott BB. Diagnosis of fatty liver disease: is biopsy necessary? *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2003;15(5):539-43.
- 59 Grant A, Neuberger J. Guidelines on the use of liver biopsy in clinical practice. *British Society of Gastroenterology. Gut.* 1999;45 Suppl 4:IV1-IV11.
- 60 Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M et al. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2005; 41; 1313–1321.
- 61 Adams L.A., Angulo P: Role of liver biopsy and serum makers of liver fibrosis in non alcoholic fatty liver disease. *Clin Liver Dis* 2007; 25-35.
- 62 Rector RS, Thyfault JP, Wei Y, Ibdah JA. . Non-alcoholic fatty liver disease and the metabolic syndrome: an update. *World J Gastroenterol.*2008; 14: 185-192.
- 63 Khashab M, Chalasani N. Use of insulin sensitizers in NASH. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2007 Dec;36(4):1067-87.
- 64 Bugianesi E, Gentilcore E, Manini R, Natale S, Vanni E, Villanova N, David E, Rizzetto M, Marchesini G. A randomized controlled trial of metformin versus vitamin E or prescriptive diet in nonalcoholic fatty liver disease. *Am J Gastroenterol* 2005;100(5):1082-90.
- 65 Belfort R, Harrison SA, Brown K, Darland C, Finch J, Hardies J, Balas B, Gastaldelli A, et al. A placebo-controlled trial of pioglitazone in subjects with nonalcoholic steatohepatitis. *N Engl J Med.* 2006. 30;355(22):2297-307.
- 66 Georgescu EF, Georgescu M. Therapeutic options in non-alcoholic steatohepatitis (NASH). Are all agents alike? Results of a preliminary study. *J Gastrointestin Liver Dis.* 2007;16(1):39-46.
- 67 Tushuizen ME, Bunck MC, Pouwels PJ, van Waesberghe JHT, Diamant M, Heine RJ. Incretin mimetics as a novel therapeutic option for hepatic steatosis. *Liver International* 2006; 26: 1015–1017.
- 68 Laurin J, Lindor KD, Crippin JS, Gossard A, Gores GJ, Ludwig J, Rakela J, McGill DB. Ursodeoxycholic acid or clofibrate in the treatment of non-alcohol-induced steatohepatitis: a pilot study. *Hepatology.*1996;23(6):1464-7.
- 69 Lindor KD, Kowdley KV, Heathcote EJ, Harrison ME, Jorgensen R, Angulo P, Lymp JF, Burgart L, Colin P. Ursodeoxycholic acid for treatment of nonalcoholic steatohepatitis: results of a randomized trial *Hepatology.*2004;39(3):770-8.
- 70 Villanova N, Moscatiello S, Ramilli S, Bugianesi E, Magalotti D, Vanni E, Zoli M, Marchesini G. Endothelial dysfunction and cardiovascular risk profile in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology.* 2005;42(2):270-2.
- 71 Targher G, Bertolini L, Rodella S, Tessari R, Zenari L, Lippi G, Arcaro G. Nonalcoholic fatty liver disease is independently associated with an increased incidence of cardiovascular events in type 2 diabetic patients. *Diabetes Care.* 2007;30(8):2119-21.

- 72 Targher G, Bertolini L, Rodella S, Zoppini G, Lippi G, Day C, Muggeo M. Non-alcoholic fatty liver disease is independently associated with an increased prevalence of chronic kidney disease and proliferative/laser-treated retinopathy in type 2 diabetic patients. *Diabetologia* 2008; 51: 444-450.
- 73 Targher G, Bertolini L, Padovani R, Poli F, Scala L, Tessari R, Zenari L, Falezza G. Increased prevalence of cardiovascular disease in Type 2 diabetic patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Diabetic Medicine* 2006; 403-409.
- 74 Howard G, Sharrett AR, Heiss G, Evans GW, Chambless LE, Riley WA, Burke GL. Carotid artery intimal-medial thickness distribution in general population as evaluated by B-mode ultrasound. ARIC Investigators. *Stroke* 1993;9:1297-1304.
- 75 O'Leary DH, Polak JF. Intima-media thickness: a tool for atherosclerosis imaging and event prediction. *Am J Cardiol.* 2002;90(10C):18L-21L. Review.
- 76 Bonora E, Kiechl S, Willeit JS, Oberhollenzer F, Egger G, Bonadonna RC, Muggeo M. Carotid atherosclerosis and coronary artery disease in the metabolic syndrome: prospective data from the Brunick study. *Diabet Care* 2003; 26:1251-1257.
- 77 Scuteri A, Najjar SS, Metter EJ, Lakatta EG, et al. Metabolic syndrome amplifies the age-associated increases in vascular thickness and stiffness. *J Am Coll Cardiol* 2004; 43: 1388-1395.
- 78 Howard G, Burke G, Evans GW, Heiss G, et al. Active and passive smoking are associated with increased carotid wall thickness: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *Arch Int Med* 1994;154:1277-1282.
- 79 Kawamoto R, Tomita H, Oka Y, Ohtsuka N, Kamitani A. Metabolic syndrome and carotid atherosclerosis: role of elevated blood pressure. *J Atheroscler Thromb* 2005; 12: 268-275.
- 80 De Pergola G, Ciccone M, Giorgino R, et al. Lower insulin sensitivity as an independent risk factor for carotid wall thickening in normotensive, non-diabetic, non-smoking normal weight and obese premenopausal women. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 2000; 24 (7): 825-9.
- 81 O'Leary DH, Polak JF, Kronmal RA, Kittner SJ, Bond MG, Wolfson SK Jr, Bommer W, Price TR, Gardin JM, Savage PJ. Distribution and correlates of sonographically detected carotid artery disease in the Cardiovascular Health Study. The CHS Collaborative Research Group. *Stroke.* 1992; 23(12):1752-60.
- 82 Targher G, Bertolini L, Padovani R, Rodella S, Arcaro G, Day C. Differences and similarities in early atherosclerosis between patients with non-alcoholic steatohepatitis and chronic hepatitis B and C. *J Hepatol.* 2007 Jun;46(6):1126-32.
- 83 Mehrhof FB, Schmidt-Ullrich R, Dietz R, Scheidereit C. Regulation of vascular smooth muscle cell proliferation: role of NF-kappaB revisited. *Circ Res.* 2005;96(9):958-64.

- 84 Mather KJ, Mirzamohammadi B, Lteif A, et al. Endothelin contributes to basal vascular tone and endothelial dysfunction in human obesity and type 2 diabetes. *Diabetes* 2002; 51:3517-3523.
- 85 Davignon J, Ganz P. Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Circulation* 2004;109:III-27-III-32.
- 86 Halcox JPJ, Schenke WH, Zalos G, et al. Prognostic value of coronary vascular endothelial dysfunction. *Circulation* 2002;106:653-658.
- 87 Corretti MC, Anderson TJ, Benjamin EJ, et al. Guidelines for the ultrasound assessment of endothelial-dependent flow-mediated vasodilatation of the brachial artery. *J Am Coll Cardiol* 2002;39:256-65.
- 88 Targher G, Bertolini L, Poli F, Rodella S, Scala L, Tessari R, Zenari L, Falezza G: Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Risk of Future Cardiovascular Events Among Type 2 Diabetic Patients. *Diabetes* 2005; 3541-3546.
- 89 Targher G, Arcaro G: Non-alcoholic fatty liver disease and increased risk of cardiovascular disease. *Atherosclerosis* 2007; 191: 235-240.
- 90 Musso G, Cassader M, Gambino R, Durazzo M, Pagano G. Association between postprandial LDL conjugated dienes and the severity of liver fibrosis in NASH. *Hepatology*. 2006;43(5):1169-70.
- 91 Loria P, Lonardo A, Targher G. Is liver fat detrimental to vessels?: intersections in the pathogenesis of NAFLD and atherosclerosis. *Clin Sci (Lond)*. 200;115(1):1-12.
- 92 Schwimmer JB, Behling C, Newbury R, Deutsch R, Nievergelt C, Schork NJ, Lavine JE. Histopathology of pediatric nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2005;42(3):641-9.
- 93 Hamaguchi M, Kojima T, Takeda N, Nakagawa T, Taniguchi H, Fujii K, Omatsu T, Nakajima T, Sarui H, Shimazaki M, Kato T, Okuda J, Ida K. The metabolic syndrome as a predictor of nonalcoholic fatty liver disease. *Ann Intern Med* 2005; 143: 722-728.
- 94 Avogaro P, Crepaldi G, Enzi G, Tiengo A. Associazione di iperlipidemia, diabete mellito e obesità di medio grado. *Acto Diabetol Lat* 1967; 4: 36-41.
- 95 Reaven GM. Banting Lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes* 1988;37:1595-607.
- 96 Ferrannini E, Haffner SM, Mitchell BD, et al. Hyperinsulinaemia: the key feature of a cardiovascular and metabolic syndrome. *Diabetologia*. 1991; 34: 416-422.
- 97 Alberti KG, Zimmet P, Shaw J. Metabolic syndrome—a new world-wide definition. A Consensus Statement from the International Diabetes Federation. *Diabet. Med*. 2006; 23, 469-80.
- 98 Musso G, Gambino R, Bo S, Uberti B, Biroli G, Pagano G, Cassader M: Should non-alcoholic fatty liver disease be included in the definition of metabolic syndrome? *Diabetes Care*, 2008; 31: 562-568.

- 99 Utzschneider KM, Kahn SE. Review: The role of insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91: 4753-4761.
- 100 Devers MC, Campbell S, Shaw J, Zimmet P, Simmons D. Should liver function tests be included in definitions of metabolic syndrome? Evidence from the association between liver function tests, components of metabolic syndrome and prevalent cardiovascular disease. *Diabetic Medicine*, 2008; 1-7.
- 101 Ruttman E, Brant LJ, Concin H, Diem G, Rapp K, Ulmer H; Vorarlberg Health Monitoring and Promotion Program Study Group. Gamma-glutamyltransferase as a risk factor for cardiovascular disease mortality: an epidemiological investigation in a cohort of 163,944 Austrian adults. *Circulation*. 2005;112(14):2130-7.
- 102 Scheen A, Luyckx F. Obesity and liver disease. *Best practice & research clinical endocrinology and metabolism* 2002; 16: 703-716.
- 103 Koda M, Kawakami M, Murawaki Y, Senda M. The impact of visceral fat in nonalcoholic fatty liver disease: cross-sectional and longitudinal studies. *J Gastroenterol*. 2007;42(11):897-903.
- 104 Stranges S, Dorn JM, Muti P, Freudenheim JL, Farinaro E, Russell M, Nochajski TH, Trevisan M. Body fat distribution, relative weight, and liver enzyme levels: a population-based study. *Hepatology*. 2004;39(3):754-63.
- 105 Siegelman ES, Rosen MA. Imaging of hepatic steatosis. *Semin Liver Dis*. 2001;21(1):71-80.
- 106 Dam-Larsen S, Franzmann M, Andersen IB, Christoffersen P, Jensen LB, Sørensen TI, Becker U, Bendtsen F. Long term prognosis of fatty liver: risk of chronic liver disease and death. *Gut*. 2004;53(5):750-5.
- 107 Kobayashi K, Akishita M, Yu W, Hashimoto M, Ohni M, Toba K. Interrelationship between non-invasive measurements of atherosclerosis: flow-mediated dilation of brachial artery, carotid intima-media thickness and pulse wave velocity. *Atherosclerosis*. 2004; 173(1):13-8.
- 108 Leinonen ES, Hiukka A, Hurt-Camejo E, Wiklund O, Sarna SS, Mattson Hultén L, Westerbacka J, Salonen RM, Salonen JT, Taskinen MR. Low-grade inflammation, endothelial activation and carotid intima-media thickness in type 2 diabetes. *J Intern Med*. 2004;256(2):119-27.
- 109 Reed D, Dwyer KM, Dwyer JH. Abdominal obesity and carotid artery wall thickness. The Los Angeles Atherosclerosis Study. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2003;27(12):1546-51.
- 110 Randomised trial of endarterectomy for recently symptomatic carotid stenosis: final results of the MRC European Carotid Surgery Trial (ECST). *Lancet*. 1998;351(9113):1379-87
- 111 Touboul PJ, Hennerici MG, Meairs S, Adams H, et al; Advisory Board of the 3rdatching the Risk Symposium 2004, 13th European Stroke Conference.

- Mannheim intima-media thickness consensus. *Cerebrovasc Dis.* 2004;18(4):346-9.
- 112 Leite NC, Salles GF, Araujo AL, Villela-Nogueira CA, Cardoso CR. Prevalence and associated factors of non-alcoholic fatty liver disease in patients with type-2 diabetes mellitus. *Liver Int.* 2009;29(1):113-9.
- 113 Volzke H, Robinson DM, Kleine V, Deutscher R, Hoffmann W, Ludemann J, Schminke U, Kessler C, John U. Hepatic steatosis is associated with an increased risk of carotid atherosclerosis. *World J Gastroenterol.* 2005;11(12):1848-53.
- 114 Brea A, Mosquera D, Martín E, Arizti A, Cordero JL, Ros E. Nonalcoholic fatty liver disease is associated with carotid atherosclerosis: a case-control study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25(5):1045-50.
- 115 Targher G, Bertolini L, Padovani R, Zenari L, Zoppini G, Falezza G. Relation of nonalcoholic hepatic steatosis to early carotid atherosclerosis in healthy men: role of visceral fat accumulation. *Diabetes Care.* 2004;27(10):2498-500.
- 116 Targher G, Bertolini L, Padovani R, Rodella S, Zoppini G, Zenari L, Cigolini M, Falezza G, Arcaro G. Relations between carotid artery wall thickness and liver histology in subjects with nonalcoholic fatty liver disease. *Diabetes Care.* 2006;29(6):1325-30.
- 117 Targher G, Bertolini L, Padovani R, Zoppini G, Zenari L, Falezza G. Associations between liver histology and carotid intima-media thickness in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25(12):2687-8.
- 118 Pacifico L, Cantisani V, Ricci P, Osborn JF, Schiavo E, Anania C, Ferrara E, Dvisic G, Chiesa C. Nonalcoholic fatty liver disease and carotid atherosclerosis in children. *Pediatr Res.* 2008;63(4):423-7.
- 119 Aygun C, Kocaman O, Sahin T, Uraz S, Eminler AT, Celebi A, Senturk O, Hulagu S. Evaluation of metabolic syndrome frequency and carotid artery intima-media thickness as risk factors for atherosclerosis in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Dig Dis Sci.* 2008;53(5):1352-7.
- 120 Dullaart RP, de Vries R, van Tol A, Sluiter WJ. Lower plasma adiponectin is a marker of increased intima-media thickness associated with type 2 diabetes mellitus and with male gender. *Eur J Endocrinol.* 2007;156(3):387-94
- 121 Mc Kimmie RL, Daniel KR, Carr JJ et al. Hepatic steatosis and subclinical cardiovascular disease in a cohort enriched for type 2 diabetes: The Diabetes Heart Study. *Am J Gastroenterol* 2008; 103:1-7.
- 122 Yavuz BB, Yavuz B, Sener DD, Cankurtaran M, Halil M, Ulger Z, Nazli N, Kabakci G, Aytemir K, Tokgozoglu L, Oto A, Ariogul S. Advanced age is associated with endothelial dysfunction in healthy elderly subjects. *Gerontology.* 2008;54(3):153-6.
- 123 Meyer MF, Lieps D, Schatz H, Klein HH, Pfohl M. Influence of the duration of type 2 diabetes on early functional and morphological markers of atherosclerosis compared to the impact of coexisting classic cardiovascular risk factors. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 2008;116(5):298-304.

- 124 Alizadeh Dehnavi R, Beishuizen ED, van de Ree MA, Le Cessie S, Huisman MV, Kluft C, Princen HM, Tamsma JT. The impact of metabolic syndrome and CRP on vascular phenotype in type 2 diabetes mellitus. *Eur J Intern Med.* 2008;19(2):115-21.
- 125 Mattsson N, Rönnemaa T, Juonala M, Viikari JS, Jokinen E, Hutri-Kähönen N, Kähönen M, Laitinen T, Raitakari OT. Arterial structure and function in young adults with the metabolic syndrome: the Cardiovascular Risk in Young Finns Study. *Eur Heart J.* 2008;29(6):784-91.
- 126 Scuteri A, Tesouro M, Rizza S, Iantorno M, Federici M, et al. Endothelial function and arterial stiffness in normotensive normoglycemic first-degree relatives of diabetic patients are independent of the metabolic syndrome. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2008;18(5):349-56.
- 127 Ghiadoni L, Penno G, Giannarelli C, Plantinga Y, Bernardini M, Pucci L, Miccoli R, Taddei S, Salvetti A, Del Prato S. Metabolic syndrome and vascular alterations in normotensive subjects at risk of diabetes mellitus. *Hypertension.* 2008;51(2):440-5.

RINGRAZIAMENTI

Ringrazio, per il loro contributo alla realizzazione di questo protocollo di ricerca:

- Dott.ssa Silvia Gaiani, Dott. David Sacerdoti per l'esecuzione delle ecografie epatiche e la quantificazione del grado di steatosi;
- Dott.ssa Maria Cristina Marescotti e Dott.ssa Raffaella Marin per i dosaggi bioumorali;
- Dott. Paolo Pellizzari (matematico) e Dott. Claudio Pizzi (statistico) per le elaborazioni statistiche e l'applicazione dell'Ordered Probit

Ringrazio inoltre:

- Dott.ssa Alessandra Cosma, Dott. Diego Cecchet, Dott. Nicola Veronese per il prezioso aiuto nello svolgimento di questo studio;
- Dott.ssa Saula de Kreutzenberg per avermi "iniziato" alla tecnica dell'ecocolordoppler;
- Prof. Paolo Tessari per gli stimoli a ragionare, per la fiducia nel mio ottimismo e per essere il mio co-relatore in questa tesi